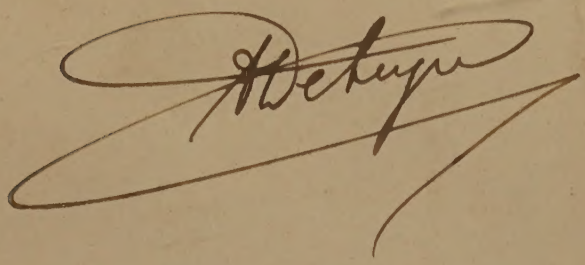
COUNTWAY LIBRARY
HC 25XP 8

BOSTON MEDICAL LIBRARY

From the Library of
William Dameshek
Harvard M.D., 1923
Professor of Medicine,
Tufts University

042

Premier prix de la Société
de médecine du nord
26 Juillet 1923
Le secrétaire général



a

TRAITÉ TECHNIQUE

D'HÉMATOLOGIE

TRAITÉ TECHNIQUE

D'HÉMATOLOGIE

MORPHOLOGIE, HISTOGENÈSE
HISTOPHYSIOLOGIE, HISTOPATHOLOGIE

PAR

J. JOLLY

Directeur du Laboratoire d'Histologie
de l'École des Hautes Études
au Collège de France.

Avec 699 figures dans le texte et une planche en couleurs.

I

A. MALOINE ET FILS, ÉDITEURS

27, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE, 27

PARIS, 1923

BOSTON MEDICAL LIBRARY
IN THE
FRANCIS A. COUNTWAY
LIBRARY OF MEDICINE

14
B
1923
2
vol. 1
copy 1

Copyright by A. Maloine et Fils, 1923.

Tous droits de reproduction, d'adaptation et de traduction
réservés pour tous pays, y compris la Suède et la Norvège

BOSTON MEDICAL LIBRARY
IN THE
FRANCIS A. COUNTWAY
LIBRARY OF MEDICINE

PRÉFACE

Ce livre s'adresse à tous les biologistes. Je désire qu'il soit, pour les médecins, une introduction à l'étude de la pathologie du sang, et que les physiologistes y trouvent la base histologique nécessaire à beaucoup de leur travaux. L'orientation des recherches biologiques est de plus en plus tournée vers les questions humorales: c'est dans les modifications physiques et chimiques des humeurs que l'on cherche surtout aujourd'hui l'explication des faits pathologiques. Mais c'est toujours la cellule, en définitive, qui est l'élément fondamental, capable de se reproduire et de maintenir la vie. L'étude des humeurs doit donc être précédée de la connaissance microscopique.

Une morphologie exacte est à la base de toute recherche physiologique. C'est cette étude morphologique que le lecteur trouvera dans ce livre. Mais le microscope n'est qu'un des outils du biologiste; l'histologie est au service de la physiologie; la connaissance de la structure doit contribuer à expliquer la fonction; elle est destinée aussi à expliquer les troubles pathologiques. L'histo-physiologie et l'histo-pathologie tiendront ici une place importante, à côté de la morphologie et de l'histogenèse.

Un traité d'hématologie, pour être complet, devrait comprendre aussi la sérologie, la chimie et la parasitologie du sang. Mais chacune de ces parties de l'hématologie forme aujourd'hui à elle seule une science spéciale ayant son objet et ses méthodes propres.

Je me suis donc arrêté aux frontières de l'histologie, me con-

tentant de donner au lecteur, en passant, quelques indications qui lui serviront à poursuivre plus loin sa route.

Si j'ai consacré un chapitre spécial à l'hémoglobine et un autre à l'hémolyse, c'est parce qu'il est impossible aujourd'hui de parler des hématies sans aborder au moins d'une façon sommaire ces grands sujets. C'est dans le même esprit que j'ai traité les chapitres consacrés aux anémies et aux leucémies. Je n'ai pas eu l'intention d'écrire une pathologie du sang, qui aurait nécessité des développements beaucoup plus longs. En parlant des anémies, des leucémies et des états voisins, j'ai pensé surtout à montrer au lecteur en quoi cette étude pouvait éclairer celle de l'hématopoièse.

L'hématopoièse forme en effet la charpente de l'ouvrage, sa partie principale et je puis dire, la plus originale. On trouvera ici un exposé complet de cet important problème d'histogenèse. Je l'ai traité autant que possible d'une manière objective et concrète, et non d'après des idées théoriques. Certains chapitres sont en réalité des mémoires originaux auxquels j'ai donné simplement, dans la rédaction, une forme didactique. J'ai essayé de lutter contre une tendance trop généralisée, qui consiste à croire que pareille étude peut être entreprise sans la connaissance approfondie des méthodes histologiques. Trop d'hématologistes ont limité leurs recherches à l'étude de préparations de sang colorées ; ils n'ont pas craint d'aborder ainsi les problèmes les plus délicats de l'histogénèse.

Procéder de cette façon, c'est un peu comme si on voulait étudier la spermatogénèse par la seule observation du liquide séminal. L'histogénèse du sang doit être étudiée comme celle des autres tissus et avec les mêmes méthodes. C'est dans les organes formateurs, bien plus que dans le sang circulant qu'il faut aller chercher la solution de ces problèmes ; d'où l'importance qui a été donnée ici à l'étude de l'aire vasculaire, du sac vitellin, du tissu conjonctif embryonnaire et des tissus hématopoiétiques en général.

Lorsqu'on compare l'étude de l'hématopoièse à celle des

autres problèmes d'histogenèse, on remarque tout de suite qu'elle comporte des difficultés spéciales.

Le sang est un tissu dissocié dont les cellules achevées sont portées par une masse liquide circulante. C'est pourquoi il faut aller étudier les éléments qui lui sont propres dans les points de l'organisme où cette dissociation n'est pas encore faite et où se trouvent les uns à côté des autres, les stades évolutifs, comme dans les épithéliums germinatifs.

Quand il s'agit de l'épiderme, de l'épithélium séminal, on est guidé, pour établir la généalogie des cellules, par la place qu'elles occupent dans les étages successifs. Pour le sang, rien de pareil. Et pourtant, les éléments nés de la multiplication et de la différenciation des cellules mères forment en général dans les tissus hématopoiétiques, de petits groupes ; aussi faut-il les dissocier le moins possible et les étudier en place. Alors, avec un peu d'attention, le lien qui les unit les uns aux autres, leurs stades successifs de division et de différenciation, apparaissent quelquefois avec une clarté évidente, sans qu'il soit besoin de faire intervenir des idées théoriques et préconçues. Des figures dans lesquelles les différents éléments ont été dessinés en place sont plus démonstratives que de longues séries de cellules choisies au hasard et alignées ensuite arbitrairement. Elles seront tout aussi claires et beaucoup plus exactes que des arbres généalogiques.

Un autre écueil, c'est le fait que l'hématopoièse est parfois troublée d'une manière intense dans certaines maladies. Assurément, l'étude des leucémies a été utile, parce qu'elle a servi de point de départ à la recherche des formes mères qui arrivent dans ce cas au sang en grand nombre, et qu'elle a conduit à les observer de plus près dans les organes. Mais se fier entièrement à ces états pathologiques pour approfondir l'histogénèse du sang, c'est un peu comme si on voulait établir les stades de la différenciation des cellules épidermiques d'après l'étude des cancers cutanés.

Que la comparaison des leucémies avec les sarcomatoses soit

provisoire ou durable, il n'importe ; ce qui est certain, c'est que l'évolution cellulaire est ici le plus souvent troublée. Il ne faut donc pas vouloir en faire le point de départ de théories histogénétiques. L'étude de l'histogenèse pathologique est utile ; elle éclaire certains côtés du problème ; mais elle ne peut remplacer l'étude de l'histogénèse dans les tissus normaux et dans les tissus de l'embryon. Elle ne peut remplacer non plus l'expérimentation, indispensable à l'étude de l'hématopoièse, d'où l'importance qui a été donnée ici à l'étude des réactions inflammatoires du tissu conjonctif. C'est l'expérimentation qui permet de constater le pouvoir complet de différenciation des cellules sanguines et qui permet aussi de ne pas confondre des aspects réactionnels et fonctionnels avec des stades véritables d'évolution.

J'ai cherché à simplifier la terminologie et à éviter les néologismes. Ici, comme pour la spermatogenèse, comme pour l'évolution épidermique, les dénominations différentes doivent s'appliquer à des stades précis de différenciation et à des individualités cellulaires suffisamment caractérisées. A ce point de vue, la morphologie comparée est d'un utile secours.

En écrivant ce livre, je me suis efforcé de donner au lecteur une vue d'ensemble des questions traitées ; mais je n'ai pas craint de montrer les lacunes de nos connaissances. J'ai pensé en effet avant tout à celui qui veut vérifier par lui-même et qui peut trouver dans ces lacunes mêmes l'idée de nouvelles recherches. C'est pourquoi j'ai donné le plus souvent possible les procédés techniques nécessaires à ces vérifications. C'est aussi en pensant aux chercheurs que j'ai écrit les paragraphes de morphologie comparée. Ils sont utiles à la synthèse, mais ils auront surtout comme avantage de guider ceux qui expérimentent. Si c'est l'observation clinique qui, en général, pose les problèmes, c'est presque toujours l'expérimentation qui les résout. Celle-ci doit s'étendre à des objets variés ; c'est souvent le choix judicieux de l'objet qui permet la solution de la question posée ; aussi ai-je ajouté quelques renseignements sur le sang des invertébrés. Ils paraîtront élémentaires aux zoologistes ; mais peut-être donne-

ront-ils aux physiologistes et aux médecins l'idée d'étendre le champ de leurs investigations.

La documentation a été l'objet de soins tout particuliers. Les travailleurs me sauront gré, je l'espère, de n'avoir pas reculé devant l'immense labeur de citer les références au bas de chaque page. Je n'ai pas cherché à être complet, mais j'ai donné les indications nécessaires. Certains mémoires cités contiennent du reste des bibliographies très étendues (1).

Le plus grand nombre des figures sont originales ou choisies dans mes propres travaux. J'ai dessiné moi-même à la chambre claire la plupart d'entre elles. J'en dois un certain nombre au talent de M. Karmanski. Ce sont des documents qui avec leur explication détaillée forment comme un second texte qui peut se lire presque sans le secours du texte principal. J'ai fait quelques emprunts, en en citant la source. Les figures 244 à 247 et 569 à 572 ont été faites d'après les dessins que j'avais exécutés pour les thèses de mes élèves, Mlle Lourié et M. Lévin. La figure 229 provient d'une préparation de M. Darier ; la figure 687 provient d'une préparation de M. Léobardy. Les figures 481 et 482 sont des reproductions partielles de clichés originaux et inédits du regretté Dominici.

Je tiens, en terminant, à remercier tous ceux qui ont apporté à ma tâche des encouragements. Et avant tout, je veux mettre à la première place le nom des deux maîtres dont l'enseignement a été toute ma vie : Ranvier, le créateur de l'histo-physiologie, Malassez, à qui nous devons tant d'ingénieuses méthodes d'analyse microscopique du sang. C'est dans leur laboratoire, entouré de ceux qui ont été leurs disciples, mes initiateurs et mes amis, qu'ont été rassemblés les matériaux de cet ouvrage. Je le dédie à leur mémoire.

M. M. Nicloux a bien voulu relire le chapitre IV consacré à l'hémoglobine ; M. G. Schaeffer a pris la même peine pour le

(1) Voir en particulier les bibliographies contenues dans Jolly, *Archives d'Anatomie microscopique*, 1907, 1910 et 1915 et *Histologie pathologique* de Cornil et Ranvier, 3e édition, II, 1902 ; — Weidenreich, *Ergebnisse der Anatomie*, 1903, 1904 et 1909 ; — Maximoff, *Beiträge f. path. Anatomie*, 1902 à 1907, et *Archiv f. mikr. An.*, 1906 à 1913.

chapitre IX consacré à l'hémolyse et M. M. Brulé m'a rendu le même amical service pour les pages consacrées à l'étude de la résistance globulaire et des états hémolytiques. Qu'ils en soient ici tous les trois, bien sincèrement remerciés.

Je dois à M. J. Comandon de précieuses photographies ultramicroscopiques, à M. Ferroux des radiographies qui m'ont été fort utiles pour la mise au point de certaines figures. Mon ami M. Cl. Regaud a bien voulu me laisser reproduire plusieurs figures empruntées à des recherches que j'ai commencées dans son laboratoire avec la collaboration de M. Coutard.

L'iconographie de ce livre n'aurait pu être menée à bonne fin sans les subventions généreuses qui m'ont été accordées par l'Académie des sciences, par l'Association française pour l'avancement des sciences et par la Caisse des Recherches scientifiques à qui j exprime ici toute ma gratitude.

Malgré les difficultés présentes, mes éditeurs, MM. A. Maloine et Fils n'ont rien négligé pour la bonne présentation de cet ouvrage. Enfin, je dois un remerciement très amical à mes excellents graveurs, MM. Demoulin qui, pendant deux ans, ont été pour moi les collaborateurs les plus empressés.

La Chaussée-sur-Marne, 1er novembre 1922.

TRAITÉ TECHNIQUE D'HÉMATOLOGIE

CHAPITRE I

MORPHOLOGIE GÉNÉRALE
PRINCIPES GÉNÉRAUX DE TECHNIQUE

Le sang est le liquide rouge qui circule dans les vaisseaux des Vertébrés. On appelle sang également, le liquide incolore ou diversement coloré qui circule dans les vaisseaux des Annélides, des Arthropodes, des Mollusques et des autres Invertébrés.

Ce qui donne au sang sa couleur rouge, c'est un pigment ferrugineux, l'hémoglobine. Cette substance est le plus souvent portée par des éléments cellulaires, comme on le voit chez tous les Vertébrés. Dans d'autres cas, l'hémoglobine est dissoute dans la partie liquide du sang ou plasma, comme on l'observe chez beaucoup de vers. L'hémoglobine peut être remplacée par un pigment bleu à base de cuivre, l'hémocyanine, qu'on rencontre chez différents mollusques et crustacés. Enfin le sang, chez un grand nombre d'invertébrés, peut être tout à fait incolore ; il ressemble alors à la lymphe : c'est l'hémolymphe.

L'hémoglobine, qui donne au sang des Vertébrés sa couleur si spéciale parmi les liquides de l'organisme, est un pigment respiratoire. Cette fonction respiratoire du sang n'est pas la seule. Le sang circule ; il est lancé par le cœur dans les organes et les tissus, il est repris par la circulation et ramené au cœur. Il reçoit dans son parcours les matériaux nutritifs qui lui sont apportés par les chylifères, les produits de la sécrétion interne des glandes, et des substances excrétées. Il se trouve ainsi placé au carrefour de tous les échanges. Sa composition microscopique, chimique, ses propriétés biologiques donnent donc des renseignements précieux sur le fonctionnement des organes. Aussi le sang est-il un objet d'étude de prédilection pour le biologiste.

Au microscope, le sang apparaît composé de cellules en suspension dans un liquide. Il peut être considéré comme un *tissu* dont les substances intercellulaires ont pris une importance considérable. C'est à ce point de vue surtout que nous l'étudierons.

La technique histologique n'exige, en général, que de très petites quantités de sang ; une simple goutte, examinée au microscope, donne déjà de précieux renseignements.

ÉTUDE DU SANG FRAIS

Le sang étant constitué par une suspension de cellules dans un liquide limpide, la goutte de sang, examinée sous une faible épaisseur, réunit les conditions de transparence et de dissociation exigées par l'observation des tissus à la lumière transmise.

Fig. 1. — Manière de faire la piqûre du doigt.

Pour examiner le sang, il faut d'abord le recueillir à l'état de pureté, sans mélange avec d'autres liquides de l'organisme.

Manière de recueillir le sang. — Chez l'homme, le sang destiné à l'examen histologique doit être recueilli au doigt. On choisit la face dorsale, où la piqûre est moins douloureuse, la peau moins exposée aux frottements et la goutte de sang beaucoup plus facile à recueillir. On nettoie l'un des doigts avec un linge propre imbibé d'alcool à 90° ou mieux d'un mélange à parties égales d'alcool absolu et d'éther. Le doigt étant bien sec, on en saisit l'extrémité de la main gauche et on fait une légère piqûre au milieu de la face dorsale de la dernière phalange. La piqûre est faite, soit avec une lancette à grain d'orge, soit avec une lancette à détente, soit simplement avec un vaccino-style qu'il est facile de flamber, ou encore avec une fine plume d'acier dont on a cassé une pointe.

La piqûre est faite transversalement à l'axe du doigt ; elle doit être peu profonde. Il ne faut ni malaxer le doigt ni l'entourer à l'avance d'une ligature à la base ; on se contente seulement, si la main est froide, de raviver la circulation par quelques frictions avant la piqûre. La goutte de sang doit sourdre seulement

à la volonté de l'opérateur, par une simple et légère pression exercée avec l'index gauche à la face palmaire.

Lorsque le sang a été recueilli, la petite hémorragie s'arrête d'elle-même; le doigt est simplement essuyé à l'alcool-éther. Si l'hémorragie continue, on se contente d'exercer quelques instants une compression avec un linge propre.

On peut se trouver en présence de cas spéciaux : peaux dures et épaisses qui exigent une piqûre plus profonde, peaux grasses et recouvertes habituellement de sueur qu'il faudra dessécher avec soin à l'alcool-éther sous peine d'erreurs causées par la dissolution ou l'altération des hématies au contact de la sueur.

Chez les tout jeunes enfants, les phalanges sont si petites qu'une piqûre à ce niveau paraît une blessure importante; mieux vaut recueillir le sang à la face dorsale du gros orteil; si un pansement est nécessaire, il sera facilement toléré.

On peut aussi recueillir le sang au lobule de l'oreille qui n'est pas exposé aux frottements et est peu sensible. C'est ce qu'on fera, par exemple, dans les cas où les doigts présenteront des lésions pouvant gêner l'examen.

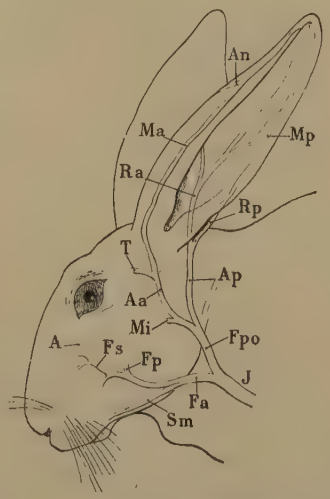


Fig. 2. — Veines superficielles de la tête chez le lapin.

Origine des veines auriculaire; — *J*, jugulaire externe; — *Fa*, faciale antérieure; — *Sm*, sous-mentale; — *Fp*, faciale profonde; — *Fs*, faciale superficielle; — *A*, angulaire; — *Fpo*, faciale postérieure; — *Mi*, maxillaire interne; — *Aa*, auriculaire antérieure; — *Ap*, auriculaire postérieure; — *T*, temporale; — *Ma*, marginale antérieure; — *Ra*, rameau antérieur de l'auriculaire postérieure (auriculaire moyenne), il est à la face interne, convexe de l'oreille; — *Rp*, rameau postérieur, passant sur la face interne de l'oreille; — *Mp*, marginale postérieure (à la face interne de l'oreille); — *An*, rameau anastomotique entre *Ra* et *Ma*.

Prise de sang chez les Mammifères. — Chez le lapin, on s'adresse en général aux veines de l'oreille, très visibles et très accessibles. Le sang de ces vaisseaux n'est pas toujours identique à lui-même. Ces veines sont très sensibles aux influences extérieures, et la circulation y est très variable; dans beaucoup de cas cependant, les différences sont négligeables. Les vaisseaux se trouvent à la face dorsale du cartilage; il y a deux veines marginales, dont l'une, l'antérieure (ou antéro-externe) se continue avec la veine auriculaire antérieure, et dont l'autre (rameau postérieur de la veine auriculaire postérieure, veine marginale postérieure ou postéro-interne) se jette dans la veine auriculaire postérieure. Ces deux veines s'anastomosent en arcade à l'extrémité de l'oreille. Il y a enfin une veine médiane, qui accompagne l'artère médiane et qui se jette aussi dans la veine auriculaire postérieure. On choisit de préférence une des veines marginales (1). On coupe les poils aux ciseaux; on pratique quelques frictions à l'alcool ou bien on dépose une goutte de xylol qui provoque presque immédiatement une vaso-

(1) Les deux veines marginales sont, comme la veine médiane, accompagnées chacune par une artère.

dilatation considérable. Il faut piquer la veine et non la sectionner. Il faut piquer franchement, avec la pointe d'un vaccino-style ou d'une aiguille.

Chez le chien, on choisit aussi la face dorsale de l'oreille, où l'on reconnaît les petites veines à leur saillie. Il en est de même chez le chat, le cheval, la vache, le porc, le singe, etc. Chez le cobaye, on trouve à la face externe du cartilage de l'oreille des veines rayonnées faciles à voir par transparence ou même à leur relief. On ponctionne la plus grosse ; on peut aussi piquer la plante du pied. Chez le rat et la souris, la section de l'extrémité de la queue est un moyen simple pour obtenir une goutte de sang ; mais le liquide recueilli de cette façon contient une petite quantité de plasma interstitiel. Si l'on veut sacrifier l'animal, il sera très simple d'aller puiser le sang dans le cœur.

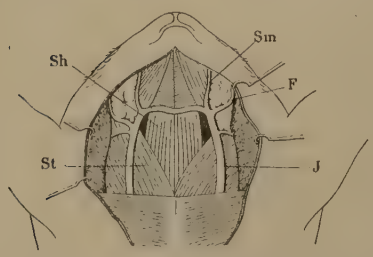


Fig. 3. — Chat. Face antérieure du cou pour montrer la situation des veines jugulaires externes (*J*), réunies par une anastomose.

F, veine faciale ; *Sm*, veine sous-mentale ; — *St*, muscle sterno-mastoïdien ; — *Sh*, muscles sous-hyoïdiens.

Ponction veineuse. — Pour l'examen histologique, il suffit de très petites quantités de sang que la piqûre des capillaires cutanés ou d'une veinule superficielle permet d'obtenir facilement. Dans certaines recherches, il est nécessaire d'obtenir des quantités de sang plus grandes. On s'adresse alors à des veines plus volumineuses, accessibles sans délabrements, ou bien on pratique la ponction du cœur.

Chez le chien, on s'adresse en général à la saphène externe, très facile à repérer et à reconnaître. Chez le chien, le chat, le lapin, le cobaye, le rat, etc., il existe de chaque côté du cou une grosse veine jugulaire superficielle, assez facilement accessible, tandis que la veine jugulaire interne, qui accompagne la carotide, est au contraire petite (1).

Après avoir par exemple, chez un lapin, enlevé les poils, on incise la peau et on met à nu la veine jugulaire. On passe un fil sous le vaisseau, qui est lié à la partie inférieure de l'incision. On introduit dans la veine l'aiguille stérilisée d'une seringue ; le sang est reçu soit directement dans un tube à essai, soit aspiré avec la seringue. Quand il s'agit d'un animal plus grand, on fait une incision au-dessus de la ligature et on introduit une canule de verre reliée au flacon récepteur par un tube de caoutchouc. Pour obtenir une plus grande quantité de sang, on place la canule dans la carotide. On lie l'artère dans la partie supérieure

Fig. 4. — Position de la veine saphène chez le chien. Face externe de la patte postérieure droite.

(1) P. Launay, Thèse, Paris, 1896.

de l'incision; on passe deux fils, une petite pince à pression est placée plus bas; on incise l'artère avec la pointe de fins ciseaux, au-dessus de la pince; l'incision est faite en deux temps : le premier temps l'incise incomplètement en travers, le deuxième temps prolonge l'incision dans l'axe du vaisseau. Une canule de verre est introduite dans l'artère, un fil assure la ligature et la canule. La pince est enlevée. Le deuxième fil est destiné à lier l'artère dans le cas où l'animal doit être conservé (1).

Chez le cheval, on choisit la jugulaire, chez les bovidés, la jugulaire superficielle, les veines mammaires; chez le mouton, l'angulaire de l'œil, les veines marginales des oreilles, la saphène externe, la veine sous-cutanée de l'avant-bras; chez le porc, les veines marginales des oreilles, la saphène externe un peu au-dessus du jarret, la sous-cutanée de l'avant-bras.

Ponction veineuse chez l'homme. — Chez l'homme, la piqure du doigt suffit en général aux recherches histologiques. Lorsqu'on voudra recueillir des quantités de sang plus grandes, on pratiquera une ponction veineuse de la façon suivante. On ligature le bras au-dessus du pli du coude avec un lien de caoutchouc. On désinfecte le pli du coude à la teinture d'iode. On se sert d'une aiguille un peu grosse, stérilisée à sec. La piqure est faite en deux temps : l'aiguille est dirigée, tangentiellement, contre la peau, dans l'axe du membre, la pointe dirigée vers la racine du bras ; on traverse la peau, puis, donnant à l'aiguille une inclinaison plus grande, on la fait pénétrer dans le vaisseau. Le sang qui s'écoule est reçu dans un tube à essai propre, stérilisé à sec.

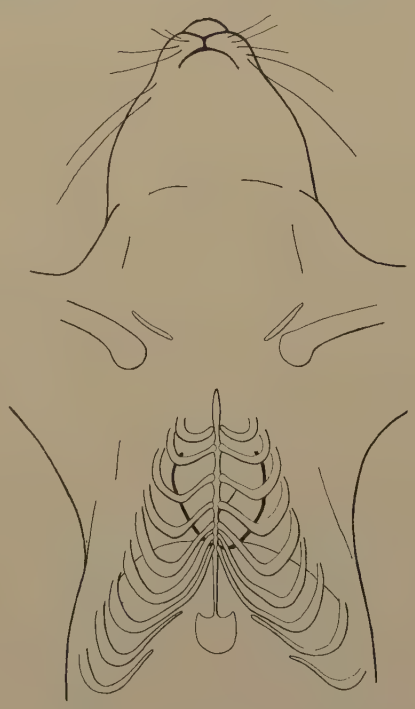


Fig. 5. — Lapin. Projection du cœur sur la face antérieure de la cage thoracique.

Ponction du cœur chez les Mammifères. — La ponction du cœur, facile à effectuer chez le chien, est encore possible chez le lapin et chez le cobaye (2). Le lapin est fixé sur le dos; on coupe les poils de la partie gauche du thorax et on désinfecte à la teinture d'iode. On a stérilisé à l'avance une seringue de 10 centimètres cubes munie d'une aiguille d'au moins 2 centimètres de long et d'un calibre un peu supérieur à celui des aiguilles employées pour les injections hypodermiques.

(1) Pour la récolte de grandes quantités de sang voir ch. VIII et aussi Bürker, in Handbuch der phys. Methodik de Tigerstedt, II, 1910.

(2) Raybaud et Hawthorn, *Réunion biologique de Marseille*, 16 juin 1903; — Nicolle et Ducloux, *S. de Biologie*, 4 juillet 1903.

Avec l'index gauche, on repère l'angle que forme avec l'appendice xyphoïde le cartilage de la 7e côte gauche. On compte les espaces intercostaux de bas en haut jusqu'au 4e, qui se trouve être en réalité le 3e espace intercostal.

La ponction est faite dans cet espace, à 3 millimètres environ du bord du sternum. La seringue est tenue comme une plume à écrire, l'aiguille dirigée en haut et en arrière, très légèrement inclinée vers le côté droit de l'animal. On la fait pénétrer brusquement et tout entière dans la cavité thoracique, puis on la ramène vers soi de 2 à 3 millimètres environ. Le sang est aspiré lentement ; puis l'aiguille est retirée brusquement. La cavité ponctionnée est le ventricule droit. L'opération est inoffensive et peut être répétée chez le même animal.

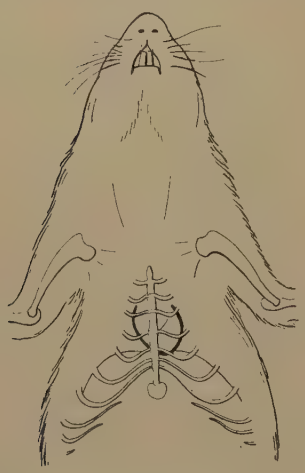


Fig. 6. — Cobaye. Projection du cœur sur la paroi thoracique.

Chez le cobaye, le lieu d'élection de la ponction est aussi le bord gauche du sternum à 8 ou 10 millimètres au-dessus du sommet de l'angle formé par la base de l'appendice xyphoïde et le dernier cartilage costal. L'aiguille inclinée légèrement vers la ligne médiane, doit pénétrer au moins de 15 millimètres.

La ponction du cœur sur l'animal vivant devient une opération très difficile chez le rat et la souris. La ponction du sinus caverneux a été recommandée (1). Elle s'applique au cobaye, au rat, à la souris. L'animal est appliqué sur le flanc contre une table, la tête immobilisée avec la main gauche. Dans l'angle interne de l'orbite, on enfonce la pointe d'une pipette modérément effilée, entre le globe oculaire et la paroi osseuse, jusqu'à ce que le sinus caverneux soit perforé, ce qu'indique la montée du sang. La pipette doit être enfoncée d'environ 5 millimètres chez la souris, 10 millimètres chez le rat, 12 millimètres chez le cobaye. L'opération est inoffensive et peut être répétée. La même voie peut être utilisée pour les injections intraveineuses.

Les instruments qui servent à la ponction des veines ou à la ponction du cœur doivent être propres et stériles. Les pipettes sont stérilisées au four à flamber. Aiguilles d'acier et seringues, placées dans des tubes à essais ou des éprouvettes bouchées avec un tampon de coton, sont aussi stérilisées à sec.

Dans certaines recherches, il sera nécessaire de se servir de pipettes paraffinées et d'aiguilles paraffinées.

Récolte du sang chez les Oiseaux. — Chez les Oiseaux, on recueille le sang des veines de l'aile. La région axillaire est mise à découvert par l'arrachement de quelques plumes. Les veines superficielles sont bien visibles.

On ponctionne la veine basilique en évitant de la sectionner. Dans certains cas, il pourra être utile d'aller chercher le sang dans la veine jugulaire. Enfin, chez certains oiseaux, les veines tibiales, très visibles et très accessibles, sont des vaisseaux de choix. Chez le pigeon, par exemple, surtout chez les variétés à pattes

(1) A. Pettit, *Société de Biologie*, 4 janvier 1913.

rouges, la veine tibiale interne est très facile à atteindre. Cette veine reposant sur un plan résistant et étant maintenue béante par ses adhérences aux tissus voisins, il est facile d'y introduire l'aiguille d'une seringue ; aussi a-t-elle été

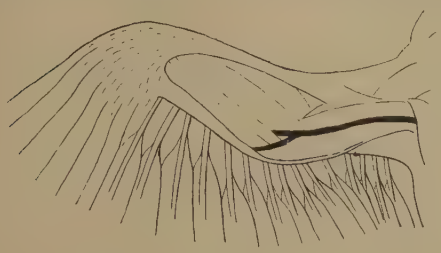


Fig. 7. — Pigeon. Face interne de l'aile droite pour montrer la situation de la veine basilique, accessible.

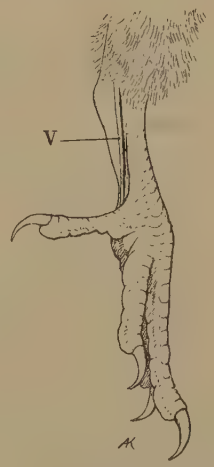


Fig. 8. — Patte de pigeon pour montrer la situation de la veine tibiale, *V*, accessible.

recommandée pour les inoculations expérimentales (1).

Pour la récolte de grandes quantités de sang, on a recommandé la ponction du cœur, comme chez le lapin et le cobaye. L'aiguille est enfoncée de côté à égale distance entre l'articulation scapulo-humérale et la pointe du bréchet (2).

Récolte du sang chez les Reptiles, les Batraciens et les Poissons. — Chez les Reptiles, à moins d'avoir affaire à des espèces volumineuses, on est, en général, obligé de sacrifier l'animal. Le sang est recueilli dans le cœur. Chez les Lacertiens, le cœur est placé très haut, vers la région jugulaire ; il est très facile à atteindre. Chez les Ophidiens, il est placé également assez haut vers la tête. Chez les Crocodiliens, il est un peu plus bas, dans la région thoracique. Chez les tortues, on ne peut l'atteindre sans sectionner la carapace. La tête est attirée au moyen d'une forte pince, l'animal sacrifié par destruction du cerveau, ou tué et immobilisé par injection dans le crâne de 1 à 2 centimètres cubes de chloroforme. On libère le plastron sternal au moyen de deux traits de scie et on recueille le sang dans le cœur.

Fig. 9. — Situation du cœur chez un lézard.

Chez les Batraciens, la prise de sang est plus facile. Il existe, chez la grenouille verte, une veine volumineuse très accessible qui permet de prendre du sang pur sans sacrifier l'animal : c'est la grande veine musculo-cutanée. L'animal est immobilisé par destruction de la moelle ou par ligature des pattes postérieures, en extension, les pattes antérieures étant attachées l'une à l'autre sur la face dorsale du corps.

(1) Pinoy, *Soc. de Biologie*, 7 décembre 1907.
(2) Nicolle et Lebailly, *Soc. de Biologie*, 24 mai et 28 juin 1919.

La grenouille étant placée sur le dos, on sectionne la peau du ventre sur la ligne médiane et on ouvre le sac lymphatique; on écarte à droite et à gauche les lambeaux cutanés et on aperçoit de chaque côté la veine musculo-cutanée qui forme aux confins de la région abdominale et de la région thoracique, une anse à concavité tournée vers la tête. Une des branches de l'anse est accolée à la paroi du corps, une autre est appliquée à la face profonde de la peau. La veine à ce niveau est très accessible, on peut y introduire la pointe effilée d'une pipette.

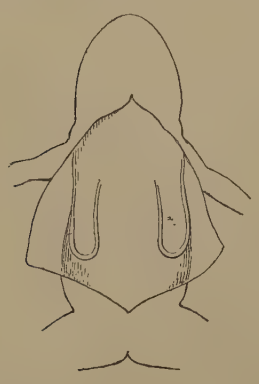


Fig. 10. — Situation des anses des veines musculo-cutanées chez la grenouille verte. Le sac lymphatique abdominal est ouvert, les veines sont appliquées contre la paroi musculaire.

S'il n'est pas nécessaire de conserver l'animal, mieux vaut encore recueillir le sang dans le cœur. Le péricarde est mis à nu et saisi avec une pince; on ouvre la cavité péricardique avec de fins ciseaux; un peu de lymphe s'écoule et le cœur fait hernie. On sectionne largement la pointe avec les ciseaux et on introduit dans la cavité cardiaque, l'extrémité d'une pipette sans toucher aux parois. Chez les Batraciens, comme chez les Reptiles et les Oiseaux, le sang se coagule avec la plus grande facilité sous l'influence du suc musculaire; il ne faut donc pas ponctionner le cœur avec la pointe de la pipette, mais l'ouvrir largement en sectionnant la pointe et introduire ensuite la pipette.

Il est possible, sur l'animal vivant, de ponctionner le cœur avec une seringue armée d'une aiguille

La grenouille rousse ne possède pas de veine cutanée facilement accessible; il faut prendre le sang dans le cœur ou ponctionner la veine faciale à la commissure. La section de l'extrémité de la queue des Urodèles (triton crété, salamandre), permet de recueillir une goutte de sang; mais cette goutte de sang est toujours mélangée à un peu de plasma interstitiel; chez les larves de batraciens, on sectionne aussi la queue.

Chez les Poissons, la section des branchies donne un sang fort impur. On peut sectionner la queue, mais mieux vaut recueillir le sang du cœur. Chez les Poissons osseux, le cœur est placé très haut, dans la région jugulaire. L'animal est d'abord sacrifié par section du bulbe; s'il n'est pas trop volumineux, on le tient de la main gauche, dans un linge, la face ventrale tournée du côté de l'observateur; s'il est volumineux, on l'immobilise dans une gouttière angulaire en bois. On aperçoit, dans la région jugulaire, une surface triangulaire limitée de chaque côté par le bord inférieur de chaque orifice branchial et en arrière par une ligne idéale réunissant les bords postérieurs des opercules. C'est là que se projette le cœur. La pointe des ciseaux étant enfoncée dans cette région, on ouvre largement la chambre péricardique, qui est située

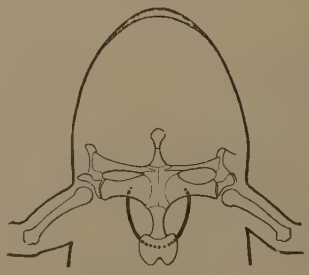


Fig. 11. — Projection du cœur sur le plastron sternal chez la grenouille verte.

profondément, sous une couche musculaire assez épaisse. Le cœur se présente alors, avec son ventricule unique, prolongé en avant par le bulbe aortique qui apparaît plus clair. On ouvre le ventricule largement avec des ciseaux et on recueille le sang avec une pipette.

Chez les Poissons osseux plats (sole, turbot), la disposition du corps est devenue asymétrique et a subi de profondes modifications qu'il faut connaître pour repérer les organes. En réalité, la face ventrale (aveugle) et la face dorsale (éclairée, pigmentée) de l'animal sont les deux faces latérales d'un poisson aplati de chaque côté et dont les organes ont été simplement déplacés. Le cœur a gardé sa situation normale, dans la région jugulaire, au-dessous des branchies ; il faut aller le chercher sur un des côtés de la circonférence du corps.

Fig. 12. — Situation du cœur chez un poisson osseux (Chevaine).

Il n'en est plus de même chez les Poissons cartilagineux plats comme la raie ou la torpille. Ici le poisson est aplati d'avant en arrière ; sa face ventrale est une véritable face abdominale. C'est là qu'il faut aller rechercher le cœur ; on est guidé, pour le trouver, par les orifices branchiaux ; le cœur est juste sur la ligne médiane, un peu au-dessous des orifices ; il est situé dans une chambre péricardique dont la paroi est souvent cartilagineuse.

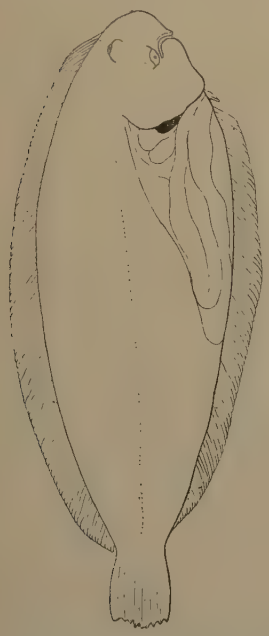


Fig. 13. — Situation du cœur (en noir), chez la sole. Animal vu par la face portant les yeux.

Manière de recueillir l'hémolymphe. — Chez tous les Vertébrés, comme nous venons de le voir, le cœur est placé en une région fixe, à la face ventrale du corps, dans sa partie antérieure, plus ou moins en avant ou en arrière suivant les cas. Chez les Arthropodes la disposition est inverse : l'axe nerveux est placé du côté ventral, le cœur est dorsal. Chez un crustacé, par exemple chez l'écrevisse commune, le cœur est du côté dorsal, sous la carapace du céphalo-thorax. L'animal étant saisi de la main gauche, la pointe des ciseaux est introduite entre le bord postérieur du céphalo-thorax et le premier anneau abdominal ; on découpe une large surface de la carapace. Le cœur est facilement mis à nu et on le voit battre. Il ne ressemble en rien à celui des Vertébrés. Il apparaît incolore, membraneux, à parois minces et fragiles ; il en sort à la section un liquide incolore transparent, qui a l'aspect de la lymphe. Les Insectes, les Arachnides, les Myriapodes ont aussi un cœur placé dans la région dorsale antérieure du corps. Chez les Mollusques, les modifications considérables apportées à la forme et au plan de symétrie du corps chez un grand nombre de ces animaux fait que la situation du cœur est très variable.

Chez les Annélides, chez le lombric, par exemple, on trouve un vaisseau dorsal et un vaisseau ventral placés sur la ligne médiane et réunis l'un à l'autre, de chaque côté, au niveau de la région antérieure du corps, par 5 à 6 arcs vasculaires dits cardiaques.

Fig. 14. — Situation du cœur (en noir), chez le turbot. Animal vu par la face aveugle.

La circulation, chez beaucoup d'invertébrés, étant partiellement lacunaire, il n'est pas toujours nécessaire d'aller puiser l'hémolymphe dans le cœur. Ainsi chez les Arthropodes, la section d'un appendice, la ponction d'une patte à la base donnent une quantité d'hémolymphe suffisante pour l'examen histologique. Mais la composition de ce liquide ne sera pas toujours la même, suivant qu'il aura été recueilli de cette façon, dans les branchies ou dans le cœur.

Manière d'examiner le sang frais au microscope.— La goutte de sang est recueillie entre une lame et une lamelle. Le verre doit être parfaitement propre, les moindres impuretés pouvant modifier les observations (1).

Pour recueillir le sang qui sort de la piqure du doigt, on approche doucement la surface de la lame de la goutte de sang, aussitôt qu'elle vient de sortir. On retourne la lame et on applique la lamelle qu'on soutient d'un côté avec une aiguille et qu'on laisse retomber avec lenteur, de façon que la goutte de sang occupe, par capillarité, tout l'espace compris entre lame et lamelle sans interposition de bulles d'air.

Dans les cas particuliers où le sang a été recueilli avec une pipette, il est plus facile d'apprécier les dimensions de la gouttelette qu'on dépose. Quand la préparation est bien faite, la couche de sang est uniforme, ne contient pas de bulles d'air et ne dépasse pas les bords de la lamelle, qu'on lute ensuite à la paraffine.

On pourra aussi employer d'autres procédés. Les lames creuses qu'on trouve dans le commerce sont en général trop profondes pour l'étude du sang. Il

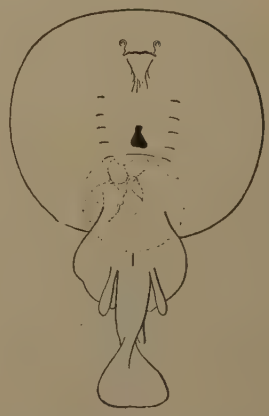


Fig. 15. — Situation du cœur (en noir) chez la torpille marbrée, projection sur la face ventrale.

(1) Les lames et les lamelles sont lavées successivement dans une solution alcaline forte, puis après rinçage, dans une solution forte d'acide chlorhydrique ou azotique. On rince, on passe à l'eau distillée et on conserve dans l'alcool.

faut les réserver à l'étude des liquides extrêmement pauvres en éléments cellulaires (lymphe, sérosités, etc.). La chambre humide de Ranvier à rigole circulaire est aussi un peu trop profonde pour l'étude du sang des Vertébrés. Elle est utile pour la lymphe, les sérosités, le sang des Invertébrés. La chambre humide de Malassez est semblable à celle de Ranvier, mais la surface du plateau est au même niveau que celle de la lame : ici, la couche liquide n'aura donc que l'épaisseur que lui donne la capillarité et cette chambre peut être utilisée pour le sang. La rainure circulaire forme réserve d'air et permet de prolonger l'observation des cellules vivantes.

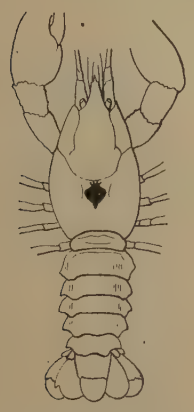


Fig. 16. — Écrevisse. Projection du cœur sur la face dorsale de la carapace.

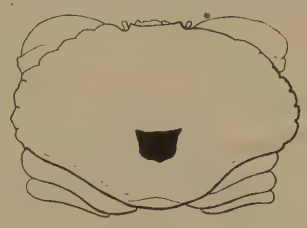


Fig. 17. — Situation du cœur chez le crabe tourteau (*Cancer pagurus*). Projection sur la face dorsale de la carapace.

Il est du reste facile d'imaginer des dispositifs divers, ménageant, autour de la gouttelette recueillie une réserve d'air. Ces procédés s'appliquent à l'étude de la lymphe et des sangs pauvres en cellules. Un des plus simples consiste à faire, avec de la paraffine, vers chaque bord de la lame porte-objet, une très mince cale sur laquelle reposera la lamelle. Un excellent procédé est aussi celui qui consiste à passer à la

Fig. 18. — Escargot (*Helix pomatia*). Projection du cœur sur la coquille.

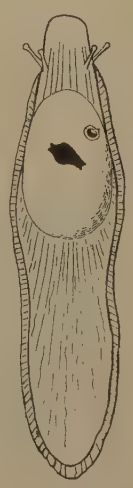


Fig. 19. — Limace rouge (*Arion empiricorum*). Projection du cœur sur la face dorsale.

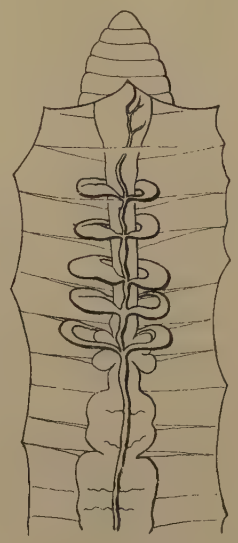


Fig. 20. — Lombric dont la paroi ventrale a été ouverte pour montrer la situation des arcs cardiaques entourant la portion antérieure du tube digestif et unissant le vaisseau ventral au vaisseau dorsal.

flamme-veilleuse d'un bec Bunsen, les quatre coins de la lamelle successivement (1) ; ils s'abaissent alors légèrement en limitant un espace capillaire entre la lame et la lamelle.

Dans certains cas particuliers, on utilise des chambres beaucoup plus creuses, pont la profondeur est déterminée par la hauteur d'un petit cylindre de verre ou par l'épaisseur d'une épaisse lamelle, perforée au centre et collée sur le porte-objet. Dans ce cas, la goutte de liquide à examiner doit être appliquée à la face inférieure du couvre-objet auquel elle reste adhérente par capillarité. Les éléments figurés sont ainsi observés en *goutte suspendue*. Cette méthode, précieuse en bactériologie, est rarement applicable à l'étude histologique du sang. Par contre, elle pourra être utilisée pour l'observation de la lymphe, du sérum, des sérosités, etc.

Fig. 21. — Manière de faire sourdre la goutte de sang après la piqûre.

On a quelquefois conseillé de recevoir la goutte de sang sur une lame lubréfiée par un corps gras. L'idée de cette technique découle d'une observation ancienne : le sang se coagule très lentement lorsqu'il est reçu dans un vase dont les parois ont été ainsi lubréfiées. Mais pour l'étude histologique, cette méthode est peu recommandable. Si lames et lamelles sont parfaitement propres, il n'y a, en général, pas lieu de se préoccuper des altérations dues au contact du verre et nous verrons que les éléments sanguins peuvent vivre, dans ces conditions, un temps extrêmement long.

RÉSULTATS OBTENUS PAR L'EXAMEN DU SANG FRAIS

Examinons maintenant au microscope, à titre d'exemples concrets, le sang de l'homme et de quelques animaux (2).

Sang de l'homme. — Il apparaît constitué par une suspension d'éléments colorés dans un plasma incolore. Les éléments colorés, qui apparaissent jaunes sont très nombreux et très petits ; de plus, ils sont arrondis et discoïdes : ce sont les *globules rouges ou hématies*. Vus de face, leur contour apparaît exactement circulaire ; au centre, on voit une tache qui apparaît assez nettement claire ou foncée, suivant la mise au point ; elle correspond à une dépression, qui existe sur chaque face du disque, comme le montre l'examen des globules vus de profil, et non à un noyau.

Si la couche de sang contenue dans la préparation est d'épaisseur

(1) Legendre, *Soc. de Biologie*, 14 février 1914.

(2) Pour la technique de l'examen du sang frais à l'ultramicroscope, voir chap. VIII. Pour les colorations vitales, voir plus loin.

convenable, les hématies se trouvent agglutinées par leur grande face et forment des piles, ressemblant à des piles de monnaie, dans lesquelles les globules présentent à l'observateur leur tranche. Ces piles se réunissent sous des angles variés et forment un réseau dont les mailles sont remplies de plasma incolore. Dans ce plasma, se voient, par places, des éléments incolores, brillants, réfringents, souvent granuleux, à contours arrondis ou parfois découpés : ce sont les *globules blancs* ou *leucocytes* qui, contrairement aux hématies, présentent des mouvements propres, lents, amiboïdes, déjà visibles à la température du laboratoire. On observe encore, par groupes, dans ces espaces, des corps plus petits que les leucocytes, incolores comme eux, mais un peu moins réfringents : ce sont les *globulins* (1).

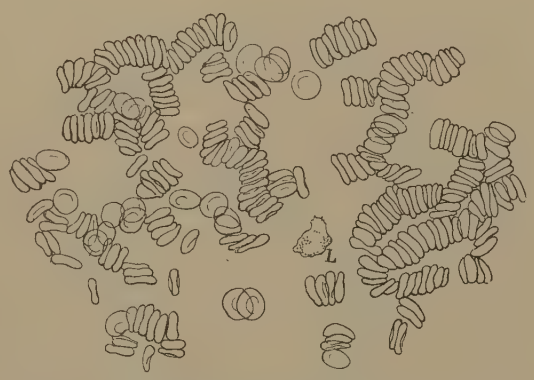


Fig. 22. — Sang d'homme examiné à l'état frais. Globules rouges isolés et agglutinés en piles. *L*, leucocyte, 500 diam.

Avec des différences de détail, tous les mammifères ont un sang analogue à celui de l'homme. Les camélides et les lamas ont seulement des hématies ovalaires, sans qu'on ait pu encore connaître la raison de cette particularité. Mais la composition du sang est la même. Comme nous l'apprendront les méthodes de coloration, les hématies des Mammifères, à la différence des leucocytes, ne possèdent pas de noyau : ce sont de vieilles cellules qui ont perdu leur noyau et qui se sont adaptées étroitement à leur fonction respiratoire.

Il n'en est plus de même chez les Batraciens, les Oiseaux, les Poissons, comme nous l'apprendra, par exemple, l'examen du sang frais de la grenouille.

Sang de la grenouille. — Le sang de la grenouille est rouge et opaque, comme celui de l'homme et des mammifères. Ici encore, le pigment est porté par de nombreux éléments. Au microscope, le plasma apparaît incolore et transparent ; en lui sont suspendus

(1) Syn. : plaquettes, hématoblastes.

les globules rouges ou hématies. Ce sont des éléments plus volumineux que ceux de l'homme, discoïdes, atteignant 25 μ dans leur plus grand diamètre. Vus de face, ils apparaissent régulièrement ovalaires, jaunes, colorés par l'hémoglobine ; au centre, on aperçoit une tache ovalaire plus claire correspondant au noyau. Vus de profil, ils ont la forme d'un fuseau dont le renflement central correspond à la place occupée par le noyau. Par places, entre ces cellules, dans le plasma, on observe des éléments incolores, brillants, réfringents, granuleux, poussant des expansions protoplasmiques et des pseudopodes à la température du laboratoire. Ce sont des leucocytes ; ils sont beaucoup moins nombreux que les hématies. Enfin, on observe, en très petit nombre, et le plus souvent par groupes, des cellules incolores immobiles, plus petites que les leucocytes et qui ont la forme de navettes : ce sont les cellules fusiformes du sang des Batraciens et des Sauropsidés dont la nature et le rôle sont encore peu connus.

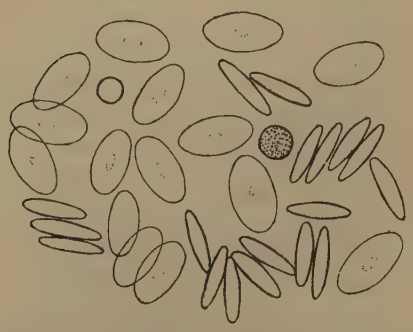


Fig. 23. — Grenouille rousse. Sang du cœur examiné à l'état frais. Hématies vues de face et de profil ; deux leucocytes, 500 diam.

Le sang des Poissons, des Reptiles et des Oiseaux présente une composition semblable à celle du sang de la grenouille. Chez les Cyclostomes, l'aspect microscopique est un peu différent, parce que les cellules rouges sont arrondies au lieu d'être ovalaires.

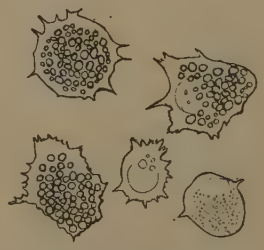


Fig. 24. — Hémolymphe de l'écrevisse examinée à l'état frais. Leucocytes. 400 diam.

Sang de l'écrevisse. — Le cœur ayant été mis à nu suivant la méthode indiquée plus haut, on recueille, avec une pipette, une petite quantité de sang incolore qu'on dépose sur le plateau de la chambre de Ranvier. On peut aussi ponctionner la base des pattes ou sectionner un appendice. On recouvre d'une lamelle, on lute à la paraffine et on examine au microscope. La préparation est transparente ; elle contient, suspendus dans un liquide incolore, un certain nombre d'éléments dont le diamètre moyen est voisin de 15 à 20 μ,

d'aspect brillant, réfringent, de forme irrégulière ou arrondie, dont la structure paraît nettement granuleuse ; certains portent même des granulations faciles à distinguer les unes des autres ; on y aperçoit souvent un champ clair, correspondant au noyau. Ces corpuscules sont incolores, mais ils peuvent contenir quelques granulations colorées.

Si la préparation a été faite à la température du laboratoire, entre 15 et 20°, on ne tarde pas à se rendre compte que les éléments anatomiques changent de forme et poussent des expansions protoplasmiques, des pseudopodes. Il s'agit là de globules blancs ou leucocytes, encore appelés amibocytes en raison de leur mobilité. Ce sont de véritables cellules, pourvues d'un corps protoplasmique et d'un noyau ; leur structure est granuleuse, leur surface nue, non limitée par une membrane ; elles sont vivantes et mobiles. Le sang de l'écrevisse, par sa composition anatomique, ressemble beaucoup à la lymphe des Vertébrés. Comme elle, il est formé d'un liquide incolore, le plasma, contenant en suspension, des leucocytes. Mais il existe entre les deux liquides, une différence importante. Le sang de l'écrevisse contient, en petite quantité, un pigment respiratoire à base de cuivre, l'hémocyanine, qu'on ne trouve pas dans la lymphe. Ce pigment existe en trop petite quantité dans le sang de l'écrevisse, pour le colorer ; mais si l'on prend l'hémolymphe d'un homard, la coloration bleue, surtout à l'air, apparaîtra avec netteté.

Sang du lombric. — On choisit un exemplaire de grande taille, on le fixe avec des épingles sur un liège, en plaçant en haut la face abdominale, reconnaissable aux stigmates génitaux. On fend la peau suivant le grand axe en ayant soin de ne pas ouvrir l'intestin. On aperçoit dans la région céphalique, vers les anneaux qui contiennent les organes génitaux, un certain nombre d'arcs vasculaires rouges entourant l'extrémité antérieure du tube digestif. Il y en a 5 ou 6 de chaque côté, réunissant le vaisseau dorsal et le vaisseau ventral. Ils sont légèrement renflés : ce sont les arcs cardiaques ou cœurs. On introduit la pointe d'une fine pipette dans l'un d'eux et on recueille une goutte de sang qu'on examine dans une chambre humide.

Ce sang est rouge. Au microscope, il apparaît transparent et uniformément coloré. Il contient, en petit nombre, des éléments anatomiques incolores, ressemblant à ceux du sang de l'écrevisse, mais plus petits, et dont les mouvements sont faciles à constater. Ce sont aussi des leucocytes. Ce sang est donc formé par un plasma coloré transparent contenant en suspension des globules blancs. La sub-

stance colorante a les réactions spectroscopiques de l'hémoglobine des Vertébrés.

Chez beaucoup d'annélides marins, le sang est rouge aussi, et de plus, il existe dans le liquide de la cavité générale de véritables cellules hémoglobiques. Mais si on excepte quelques espèces d'annélides ou de mollusques, c'est seulement chez les Vertébrés qu'apparaissent d'une manière constante et régulière dans le sang, des cellules complètement adaptées à la fonction respiratoire. Plus cette fonction devient importante, plus les cellules hémoglobiques sont nombreuses et petites : le sang d'un pigeon contient des hématies plus nombreuses et plus petites que celui d'une grenouille. Le pigment respiratoire est distribué sur un plus grand nombre d'éléments et les surfaces d'échange sont multipliées. Ces conditions se trouvent encore plus parfaitement réalisées chez les Mammifères.

EXAMEN DU SANG FRAIS DANS LES VAISSEAUX
EXAMEN DU SANG CIRCULANT

Un grand nombre de membranes transparentes et vascularisées permettent d'examiner au microscope le sang, dans les vaisseaux mêmes. Chez la grenouille, la membrane interdigitale, le mésentère peuvent être examinés de cette façon. Les membranes sont étalées sur la lame avec des aiguilles, rapidement, sans l'addition d'aucun réactif ; on dépose une goutte de sérosité péritonéale recueillie avec une pipette. On recouvre d'une lamelle qui repose sur deux cales de paraffine faites à l'avance aux deux bords opposés de la lame. On lute à la paraffine. Le mésentère, le centre phrénique et l'épiploon du lapin se prêtent aussi à cette expérience ; on couvre la membrane avec un peu de sérosité péritonéale recueillie avec une pipette.

Il est en général plus avantageux de faire l'observation sur l'animal vivant, quand les conditions de l'expérience sont réalisables. On élimine ainsi bien des causes d'erreur. Pour faire ces observations, il existe de nombreux objets : membrane interdigitale et langue de la grenouille, queue des alevins de poissons, expansion membraneuse de la queue des têtards, etc. Ici, l'observation est faite sur des parties extérieures et l'on ne fait subir à l'animal aucune mutilation. Mais on peut aussi, après avoir pratiqué une incision, attirer au dehors un organe transparent : poumon, mésentère, vessie de la grenouille ; mésentère, vessie de petits mammifères, etc. (1). Les ani-

(1) Voir Ranvier, *Traité technique d'histologie*, Paris, 1889.

maux qui servent à ces expériences doivent être immobilisés. On immobilise une grenouille par injection de 1 à 2 gouttes d'une solution de curare au 1/1000. On immobilise un têtard en l'immergeant dans une solution de curare à 1 p. 1000 après avoir pratiqué une piqûre à ses téguments.

Un des objets les plus remarquables pour l'observation de la circulation capillaire est le poumon de la grenouille. Il faut que le poumon soit gonflé d'air. Il l'est quelquefois naturellement. On arrive aussi à le remplir en se servant de la canule de Holmgrem. On applique à sa surface une lamelle maintenue par une petite pince à pression reposant sur une boule de cire molle. Mais l'objet le plus célèbre et le plus favorable est le mésentère de la grenouille, sur lequel *Poiseuille* a fait ses observations sur la circulation capillaire et sur lequel *Cohnheim* a étudié plus tard la diapédèse des leucocytes (1).

Chez les Mammifères, le mésentère et la vessie des petits rongeurs, l'épiploon du chien et surtout la membrane de l'aile de la chauve-souris peuvent être utilisés (2). Nous y reviendrons dans le chapitre suivant.

PRÉPARATIONS PERSISTANTES
PRINCIPES GÉNÉRAUX DE LA FIXATION

L'examen du sang frais ne donne que des renseignements très généraux sur sa composition histologique. Il ne permet pas de constater, par exemple, avec certitude, que les hématies des Batraciens sont de véritables cellules et que les hématies des Mammifères n'ont pas de noyau. De plus, dans les préparations de sang frais, les hématies ne tardent pas à subir des altérations. Il faut donc s'adresser à des procédés de fixation et de coloration permettant d'obtenir des préparations persistantes dans lesquelles les détails de structure sont devenus bien apparents. Les principes de technique que nous allons étudier s'appliquent à la fois à l'étude du sang et à l'étude des tissus hématopoiétiques (3).

On entend par *réactif fixateur* un réactif qui immobilise dans leur intégrité de forme, de dimensions et de structure les éléments

(1) Voir les détails de cette expérience au chap. v.

(2) Jolly, *Archives d'An. micr.*, XI, 1909.

(3) Nous ne donnerons dans ce chapitre que les méthodes générales de la technique histologique (fixation et coloration) appliquées à l'étude du sang et de l'hématopoièse. Les autres méthodes seront exposées à propos de chaque cas particulier, dans les chapitres suivants.

anatomiques et qui les protège contre l'action ultérieure des liquides dans lesquels ils doivent être ensuite traités et conservés.

Ces réactifs fixateurs agissent de différentes façons, mais surtout en coagulant, précipitant les albuminoïdes protoplasmiques.

Les propriétés d'un réactif fixateur ne sont pas les mêmes que celles d'un réactif conservateur. Ce dernier conserve l'intégrité des éléments anatomiques tant que ceux-ci se trouvent immergés dans le liquide. Mais si le tissu est retiré du réactif, les éléments redeviennent altérables. Au contraire, le fixateur, n'agissant que pendant un certain temps sur un tissu, confère à celui-ci une certaine résistance vis-à-vis des réactifs qui doivent être employés ultérieurement pour achever la préparation (1).

Beaucoup de réactifs fixateurs, employés en solution très diluées, produisent sur les tissus un effet particulier : ils fixent les cellules, mais sont impuissants à fixer convenablement les ciments intercellulaires qui agglutinent les éléments anatomiques. Il en résulte que des actions mécaniques suffisent ensuite à séparer les cellules les unes des autres. Ces réactifs sont dits *dissociateurs*. Ils ne s'appliquent pas à l'étude du sang qui est un tissu naturellement dissocié ; mais ils trouvent leur emploi dans l'étude des tissus hématopoiétiques.

Choix du fixateur. — Pour obtenir une bonne fixation, il faut que le tissu soit prélevé rapidement et dans des conditions telles que les réactifs agissent sur lui lorsqu'il est vivant et avant toute altération. Il faut aussi choisir un réactif fixateur approprié.

Un même fixateur ne fixe pas indifféremment tous les tissus et peut agir très différemment sur les différentes parties d'un tissu ou même d'une cellule. Ainsi, une solution saturée de sublimé à laquelle on a ajouté 5 p. 100 d'acide acétique et qui fixe très bien les noyaux des leucocytes et des hématies, altère au contraire l'hémoglobine. Inversement, une solution de bichromate de potasse à 3 p. 100 fixera l'hémoglobine dans des conditions où les structures nucléaires seront mal fixées. C'est cette diversité d'action des fixateurs qui fait qu'on associe en général plusieurs substances différentes dans le même réactif pour profiter en même temps de leurs avantages particuliers.

L'action d'un réactif fixateur varie naturellement suivant le titre de

(1) Au sortir de certains fixateurs (solutions de sublimé acétique, solutions d'acide picrique, etc.), les tissus sont altérés par l'eau ; cela tient à ce que l'action fixatrice, bien que réelle, est insuffisante pour contrebalancer l'action gonflante ou solvante de l'acide dilué dans l'eau de lavage, ou même de l'eau seule et que les précipités albumineux formés par ces liquides sont partiellement solubles dans l'eau.

la solution et la nature du dissolvant. L'intensité et la rapidité de cette action ne sont nullement proportionnées au titre de la solution. La durée d'action du fixateur a naturellement beaucoup d'importance ; mais ce qu'il faut connaître d'abord, c'est son pouvoir de pénétration. La qualité du fixateur dépend non seulement de son action propre, en tant que corps chimique, mais aussi de son mode et de sa rapidité de pénétration ; car s'il pénètre très lentement dans le fragment prélevé, les parties centrales auront eu le temps de subir des altérations cadavériques et le réactif ne fixera qu'un tissu déjà modifié.

On sait ce qu'on entend par phénomène de diffusion. La diffusion ne se produit pas seulement dans les liquides ; elle se produit aussi à travers les corps solides poreux. On en a une idée très nette en versant une goutte d'une solution aqueuse colorée sur un papier-buvard blanc. La goutte s'agrandit lentement et la périphérie de la tache est en général incolore : l'eau diffuse plus vite que la matière colorante.

Des faits analogues se produisent lors de la pénétration des réactifs fixateurs dans les tissus ; les choses sont seulement un peu plus compliquées, parce qu'elles dépendent beaucoup de la composition du tissu, de son degré de porosité, de la nature des liquides dont il est imbibé.

On conçoit sans peine l'importance de ces faits. Si la substance fixatrice diffuse très lentement, et n'atteint graduellement les cellules que longtemps après l'eau de la solution, elle pourra ne fixer que des éléments déjà altérés par l'eau. Cet inconvénient n'existera pas si la diffusion de la substance active a été rapide. Dans certains réactifs complexes, on ajoute à la solution aqueuse des sels neutres conservateurs (chlorure de sodium, sulfate de soude) qui diffusent rapidement et atténuent l'action modificatrice de l'eau. Lorsqu'on emploie des fixateurs composés, les différents corps dissous dans le le mélange ne pénètrent pas avec la même rapidité.

La rapidité de pénétration des acides, leur action gonflante, éclaircissante, sur diverses parties des tissus, les a introduits depuis longtemps dans la technique histologique ; ils entrent dans la composition de beaucoup de fixateurs usuels. Mais si leur action gonflante n'est pas arrêtée à temps par une substance fixatrice à pénétration assez rapide, ils peuvent avoir des effets destructeurs.

La vitesse de pénétration des réactifs fixateurs dépend encore de la nature des liquides interstitiels. La plupart des réactifs fixateurs produisent une coagulation de ces liquides ; la nature ou l'intensité

de cette coagulation peut dans certains cas ralentir considérablement la diffusion ultérieure du réactif ou même l'éviter. Dans d'autres cas, la réduction du réactif au contact du tissu formera une barrière infranchissable comme cela se produit, par exemple, pour les solutions d'acide osmique en présence de la graisse. Il y a donc à considérer la *vitesse de pénétration* et le *pouvoir de pénétration* d'un réactif déterminé agissant sur un tissu donné.

La vitesse de pénétration dépend à la fois du pouvoir diffusant et du pouvoir coagulant de la solution et aussi de la constitution du tissu. On trouve à ce sujet de grandes différences suivant les tissus, différences tenant à leur structure (actions capillaires) et à leur composition physico-chimique (formation de membranes de précipitation limitant la diffusion). La vitesse de diffusion dépend aussi de la température ; il y aura souvent intérêt à faire agir le fixateur à une température de 30 à 37° (1).

La plupart des fixateurs agissent en précipitant les albumines des tissus. Si on fait agir les solutions fixatrices *in vitro*, sur des solutions de ces corps, on constate que certains fixateurs les précipitent toutes (sublimé, acide chromique) tandis que d'autres n'en précipitent qu'une partie, ou ne les précipitent qu'en solution acide (bichromates alcalins). Ce qui est plus important, c'est que les précipités formés sont souvent insolubles dans l'eau (acide chromique, bichromates en solution acide, etc.), ce qui est un résultat excellent, mais parfois sont solubles dans l'eau en partie (acide picrique, sublimé, formol), ce qui est important pour le traitement ultérieur de l'objet. Fixation n'est pas synonyme de précipitation des albuminoïdes protoplasmiques, car d'excellents fixateurs, comme l'acide osmique et le formol, très employés dans l'étude du sang et des tissus hémopoétiques, n'ont qu'un pouvoir coagulant très faible. La manière dont ils agissent sur la substance vivante est beaucoup plus compliquée.

Les réactifs fixateurs ne précipitent pas les substances cellulaires sous une forme toujours homogène, mais souvent sous forme de

(1) D'une manière générale, la vitesse de pénétration est beaucoup plus grande pour les réactifs contenant de l'acide acétique. Ainsi pour le tissu lymphoïde, pour la rate, avec le sublimé acétifié à 5 p. 100, la vitesse de pénétration est d'environ 8 à 10 dixièmes de millimètre dans la première heure et de 20 dixièmes de millimètre au bout de 4 à 5 heures. Avec le bichromate-sublimé acétique, elle est un peu moindre. Avec le bichromate-sublimé formolé à 5 p. 100 elle est de 5 à 6 dixièmes de millimètre au bout d'une heure et de 10 à 12 au bout de 5 heures. La pénétration se faisant par les deux grandes faces du fragment, elle sera complète en 5 heures pour un fragment lamelleux d'une épaisseur inférieure à 2 millimètres. Voir aussi Mann, *Physiological Histology*, et Tellyesniczky, Fixation in *Encyclopédie technique d'Ehrlich*.

grains ou de filaments, d'où des aspects artificiels qui peuvent en imposer pour de véritables structures. De même, ils peuvent produire des vacuoles et des aspects alvéolaires. Enfin ils peuvent précipiter à la surface de la cellule les liquides interstitiels sous une forme granuleuse, filamenteuse, réticulée, artificielle. Dans ces différents cas, c'est le plus souvent l'observation de l'objet vivant qui jugera la question de la nature artificielle ou réelle de ces structures.

Il faut tenir compte aussi des propriétés solvantes du fixateur. Dans la cellule, il y a autre chose que des substances albuminoïdes précipitables ; dans sa constitution, entrent des lipoïdes, du glycogène, de la cholestérine, des lécithines, etc., que le fixateur conserve ou dissout. L'alcool, par exemple, qui précipite beaucoup d'albuminoïdes protoplasmiques, est aussi un dissolvant énergique pour beaucoup de corps qui disparaissent après son action ou ne laissent qu'une place vide sous forme de vacuole. Ces considérations s'appliquent à l'hémoglobine des hématies, soluble ou précipitable dans beaucoup de fixateurs usuels.

Beaucoup de facteurs interviennent donc dans la fixation. C'est ce qui fait que malgré les observations *in vitro*, la fixation des tissus reste encore une chose empirique, chaque recherche nouvelle exigeant des essais.

Pratique de la fixation. — La grandeur des fragments à mettre en contact avec le fixateur, la quantité de liquide à employer et le temps de séjour varient suivant les cas particuliers et dépendent la nature des tissus et des propriétés du fixateur. D'une manière tout à fait générale, on peut dire qu'il y aura avantage à prendre des fragments très minces, à les mettre dans une quantité de liquide assez grande et à ne les laisser que le temps suffisant pour que la pénétration soit complète. A part les cas où un séjour prolongé est utilisé comme mordançage pour les colorations ultérieures, mieux vaut en général que l'objet ne séjourne que le minimum de temps nécessaire. On le débarrasse alors par un lavage à l'eau courante, ou par immersion dans l'eau distillée, de l'excès du fixateur. Après l'emploi de certains réactifs (sublimé saturé, sublimé acétique, acide picrique saturé, solutions picro-formolées, solutions formolées sans bichromates, etc.), l'objet est porté directement dans l'alcool faible (30° à 70°, suivant les cas), et non dans l'eau — les précipités formés étant partiellement dissous dans l'eau ou certaines parties étant gonflées, altérées par l'excès d'acide dissous dans l'eau du lavage.

Les principes que nous venons d'exposer s'appliquent au sang comme aux autres tissus. Seulement, les éléments anatomiques se trouvant ici naturellement dissociés, il n'y a pas lieu, le plus souvent, de se préoccuper de la pénétration du fixateur, qui est très rapide. Il n'en est plus de même lorsqu'au lieu de fixer le sang directement, on le fixe dans les tissus, dans les vaisseaux, ou lorsqu'on étudie les organes hémopoiétiques. Lorsqu'on le fixe directement, le sang, par le fait

même qu'il est un liquide et une suspension exige des méthodes histologiques un peu spéciales. Dans ces méthodes, on se préoccupe, non seulement de fixer les éléments, mais de les retenir adhérents à la lame de verre sur laquelle on les a recueillis.

MÉTHODES DE FIXATION DU SANG

Les méthodes de fixation du sang peuvent être divisées en deux catégories, suivant qu'on fait agir le réactif fixateur sur le sang préalablement étalé sur lame et desséché, ou sur le sang frais.

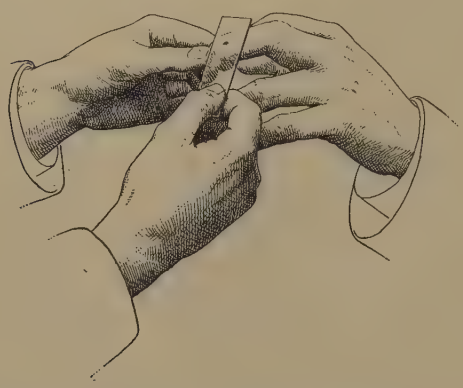


Fig. 25. — Manière de recueillir la goutte de sang sur la lame.

Fixation du sang par dessiccation — On a préparé à l'avance une lame ordinaire et une lame à bords rodés, toutes deux bien propres, bien dégraissées et desséchées. La goutte de sang est reçue un peu excentriquement a la surface de la lame ordinaire. Cette lame étant tenue de la main gauche, la main droite plonge le bord de la lame rodée dans la goutte de sang et faisant d'abord un mouvement d'arrière en avant, force le liquide sanguin à adhérer à toute la largeur de la lame. Inclinant ensuite légèrement la lame rodée, on étale doucement le sang par un mouvement de gauche à droite. Puis on agite la lame pour accélérer la dessiccation, mais sans la chauffer (1).

Au moment où l'on va recevoir la goutte de sang sur la lame, on peut passer celle-ci au-dessus d'une flamme pour qu'elle soit bien sèche. Mais il ne faut pas dépasser une température de 40°, qu'on apprécie sur le dos de la main — sans quoi les globules pourraient subir des altérations. Dans le mouvement d'étalement de gauche à droite, il est bon d'appuyer le bord de la lame rodée un peu plus sur le bord inférieur de la préparation, afin de limiter entre ces deux lames un espace angulaire qui empêche les globules d'être écrasés.

La fixation obtenue par la dessiccation est une fixation incomplète. Les préparations ainsi faites s'altèrent lorsqu'elles sont exposées à l'humidité. Si on les trempe dans l'eau, l'hémoglobine se dissout, tous les globules se décolorent. Cependant,

(1) On a recommandé un grand nombre de procédés d'étalement du sang sur lame. Nous indiquons un des plus anciens et des plus simples, mais beaucoup d'autres sont excellents. Pour l'étude histologique, il faut éviter tous ceux qui exposent les éléments figurés à être écrasés ou étirés, comme par exemple, l'écartement brusque de deux lamelles adhérant l'une à l'autre par une mince couche de sang intermédiaire — et tous ceux qui rentrent plus ou moins dans la méthode dite des frottis qui ne convient guère qu'aux recherches microbiologiques.

les préparations desséchées depuis plusieurs semaines sont réellement fixées et insensibles à l'action de l'eau (1). Le fait tient probablement à une dessiccation plus complète, car la chaleur à la même action. Si en effet on maintient pendant 10 minutes la préparation qui vient d'être desséchée sur une plaque chauffante, portée à 120° environ, la préparation est définitivement fixée.

La fixation ne se produit que si le sang est bien étalé en couche mince et si la dessiccation est rapide. Si on laisse sécher lentement une petite goutte de sang abandonnée à elle-même sur la lame, les hématies se sont fixées que sur les bords, là où la dessiccation a été rapide (2).

La simplicité de la méthode de dessiccation en rend l'emploi précieux en clinique. Mais avant de faire agir les solutions colorantes, il faut achever la fixation soit en portant la lame sur une plaque chauffant à 110° pendant 2 heures (3), soit en faisant agir sur elle différents réactifs : acide chromique, alcool absolu, etc.

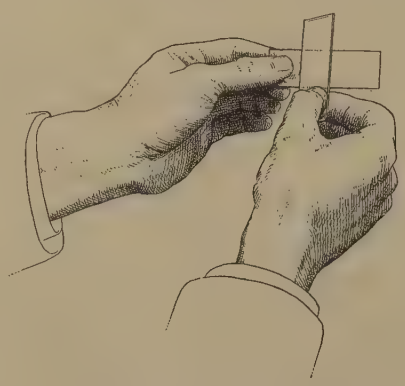


Fig. 26. — Manière d'étaler la goutte de sang.

Acide chromique en solution à 1 p. 100. — On plonge la lame une ou deux secondes dans la solution, et on la rince ensuite ; on la laisse dans l'eau jusqu'au moment de la coloration. La lame fixée par l'acide chromique ne doit pas sécher avant de recevoir la solution colorante (4).

Alcool absolu et alcool-éther. — On emploie l'alcool absolu ou un mélange à parties égales d'alcool absolu et d'éther conservé dans un flacon compte-gouttes. On place la lame sur un support; on verse le liquide fixateur sur la lame de façon à baigner largement la tache de sang et on laisse évaporer ; un contact de quelques minutes est suffisant. La préparation est portée ensuite dans l'eau, puis dans les solutions colorantes. L'acétone, l'alcool méthylique peuvent être employés de la même façon.

Vapeurs osmiques. — On remplit à moitié de sa hauteur, un petit flacon à large encolure, avec une solution d'acide osmique à 1 p. 100. Il faut que la solution soit parfaitement limpide et qu'elle émette, à la température ordinaire, des vapeurs dont l'odeur est caractéristique et qui sont irritantes pour la muqueuse nasale. Il

(1) Ces préparations anciennes se colorent en général moins bien.

(2) Voir chap. IV, examen médico-légal.

(3) Ce procédé, dû à Ehrlich, est surtout utile dans la recherche des réactions colorantes parce qu'il permet d'éviter l'introduction des réactifs chimiques. Pour obtenir les résultats indiqués par Ehrlich, il est parfois nécessaire de prolonger le temps d'exposition pendant une heure ou deux. Pour régler la température on peut se servir d'un thermomètre placé dans un support métallique et maintenu sur une plaque chauffante. Sans thermomètre, on peut se servir du toluène dont le point d'ébullition est à 110°. Ehrlich a recommandé l'emploi d'une petite marmite à ébullition continue dont le couvercle forme plaque chauffante et dans laquelle du toluène est porté à l'ébullition.

(4) Les bichromates alcalins qui fixent très bien les globules rouges dans les tissus, fixent mal le sang desséché sur lame, même lorsqu'on les emploie en solution forte.

n'est pas nécessaire de chauffer. On place la lame sur le goulot du flacon ouvert, la couche de sang en bas, regardant la solution, dont elle reçoit les vapeurs. On laisse la préparation exposée environ 30 à 60 secondes. On la porte ensuite dans l'eau distillée, puis dans les solutions colorantes (1).

Fixation du sang frais. — La dessiccation est une méthode assez brutale qui ne peut s'appliquer à tous les cas. Elle est extrêmement utile dans les recherches cliniques et parasitologiques. Elle ne peut suffire à l'étude histologique du sang, particulièrement lorsqu'il s'agit des anémies, des leucémies et du sang des Vertébrés inférieurs. Chaque fois qu'on voudra étudier les structures cellulaires, il faudra s'adresser à d'autres méthodes dans lesquelles on fait agir les réactifs sur le sang frais, sans dessiccation préalable. On obtient ce résultat de différentes façons : soit en faisant agir sur le sang simplement étalé des vapeurs fixatrices et en obtenant l'adhérence par une dessiccation consécutive à la fixation — soit en se servant de fixateurs coagulants qui appliquent la couche de sang à la lame — soit en faisant sédimenter le sang dans des solutions fixatrices non coagulantes et en recueillant ensuite le dépôt.

Fixation du sang frais par les vapeurs osmiques. — La goutte de sang est étalée sur la lame comme d'habitude, mais au lieu de laisser se dessécher la couche de sang, on l'expose immédiatement aux vapeurs, en retournant la lame et en l'appliquant sur l'ouverture du flacon pendant 30 secondes. On laisse ensuite sécher. Puis, on met la lame dans l'eau et l'on colore (2).

Cette méthode peut être considérée comme une méthode générale ; elle donne des résultats excellents dans presque tous les cas. Elle permet l'emploi ultérieur

(1) La fixation par les vapeurs dégagées d'une solution saturée de sublimé dans l'alcool absolu à laquelle on ajoute une forte proportion de teinture d'iode, a été recommandée par Lenoble et Dominici. Cette méthode ne donne de bons résultats qu'après une courte fixation préalable par les vapeurs osmiques. L'iode joue donc le rôle d'un mordant pour la couleur plutôt que celui d'un fixateur histologique.

(2) L'acide osmique est livré dans le commerce sous forme de cristaux jaune-verdâtres conservés en ampoules scellées. Le contenu de chaque ampoule est en général de 1/2 gr. On nettoie convenablement l'ampoule à l'eau acidulée, puis à l'alcool et à l'éther, afin qu'elle soit bien dégraissée. On prépare un flacon bouché à l'émeri d'une capacité de 80 à 100 centimètres cubes qu'on a nettoyé avec le plus grand soin et rincé à l'eau distillée ; on y verse 50 centimètres cubes d'eau distillée. Saisissant l'ampoule dans un linge propre et sec, on pratique un trait de lime près de l'une de ses extrémités ; puis chauffant au rouge le bout d'une baguette de verre, on l'approche du trait de lime ; l'ampoule s'ouvre ; on la jette entière avec son contenu dans le flacon. Les cristaux ne se dissolvent pas à froid ; le flacon étant bien bouché, on le chauffe doucement au bain-marie. A une température peu élevée, on voit les petits cristaux se fondre et se réunir en une grosse goutte d'aspect huileux qui reste au fond du flacon. Il suffit alors de retirer le flacon du bain-marie et de l'agiter violemment pour obtenir instantanément la solution. La lumière réduit à la longue les solutions d'acide osmique, mais cette action est moins importante qu'on ne le croit généralement ; si elles ont été bien faites, les solutions se conservent, incolores et limpides, pendant très longtemps.

de presque toutes les colorations, avec ou sans mordants. On peut l'utiliser aussi pour fixer la lymphe. Mais on étalera le liquide sur la lame d'une manière un peu différente, à cause du petit nombre des éléments qu'il contient : on dépose la gouttelette sur le centre de la lame et avec l'extrémité arrondie d'une pipette effilée à la lampe, on l'étale par un mouvement circulaire et en s'éloignant du centre.

Les vapeurs d'iode, les vapeurs de formol ont été employées aussi pour fixer le sang frais. Elles donnent des résultats très incertains et sont peu recommandables.

Fig. 27. — Batterie de tubes à lames pour fixation et coloration.

Fixation du sang frais par les mélanges coagulants. — Dans la méthode précédente, l'adhérence des globules à la lame est obtenue par dessiccation après la fixation. On peut obtenir l'adhérence en se servant de réactifs coagulants et fixateurs (acide chromique, sublimé, etc.). Les meilleurs de ces liquides sont les mélanges chromo-osmiques et chromo-osmio-acétiques. Ces mélanges sont très usités dans la technique histologique, et il en existe de nombreuses formules. Ils faut qu'ils ne contiennent qu'une très faible proportion d'acide acétique ; les formules de Flemming en contiennent trop et altèrent l'hémoglobine. On pourra employer le mélange suivant :

Fig. 28. — Flacon à lames.

Solution d'acide chromique à 1 p. 100 . . .	30 cc.
Solution d'acide osmique à 1 p. 100	10 cc.
Acide acétique	1 goutte.

Les solutions sont faites dans l'eau distillée ; on conserve le mélange chromo-osmique ; le mieux est de n'ajouter l'acide acétique qu'au moment d'utiliser le réactif. On étale la goutte de sang sur la lame comme précédemment, et tout de suite, sans laisser dessécher, on plonge la lame dans un vase contenant le mélange fixateur. On se sert de tubes aplatis pouvant contenir, par exemple, deux lames accolées. On laisse 3 à 4 minutes, et on lave ensuite en plongeant la préparation dans un verre plein d'eau qu'on place quelques minutes sous un filet d'eau courante. On fait agir ensuite le colorant, sans laisser sécher (1).

Cette méthode est extrêmement précieuse pour l'étude des structures cellulaires ; elle s'applique particulièrement à l'étude des leucocytes du sang, à l'étude du sang des Sauropsidés ; elle est fort utile pour l'étude du sang des leucémies (2). Mais elle fixe mal les hématies des Mammifères qui sont en général très déformées par les courants de liquide.

(1) Jolly, *Soc. de Biologie*, 8 juin 1901 et *Archives de méd. exp.* 1902.

(2) C'est la seule méthode qui permette de fixer convenablement, dans le sang, les myéloblastes et leucoblastes.

Cette méthode est applicable à la lymphe et au sang pauvre en cellules des Invertébrés : mais il faut alors étaler la gouttelette par un mouvement circulaire avec l'extrémité arrondie d'une pipette effilée et fermée. Puis, au lieu de plonger la lame dans le réactif, on verse sur elle une partie du liquide fixateur ; on attend qu'il se soit produit un certain degré de coagulation ; on achève la fixation en plongeant doucement la lame dans le réactif. On peut aussi recouvrir la goutte de lymphe d'une lamelle et faire passer la solution fixatrice sous la lamelle.

Les solutions saturées de sublimé (1) simples ou légèrement acétifiées (0,5 à 1 p. 100) peuvent être employées sur le sang frais exactement comme les solutions chromo-osmiques. La lame, recouverte d'une couche de sang bien étalée, mais non desséchée, est plongée dans la solution de sublimé, où elle reste environ 10 minutes. Elle est mise ensuite directement dans l'alcool à 70° auquel on ajoute un peu de teinture d'iode ; après 10 à 15 minutes, on traite par l'alcool à 70° pour enlever l'excès d'iode et on plonge dans l'eau.

Le traitement par l'iode est destiné à enlever l'excès de sublimé par formation d'un iodo-chlorure soluble et à prévenir les précipités de mercure dans la préparation. Ces précipités de mercure métallique apparaissent comme de petites gouttelettes noires ; elles se produisent à l'extrémité de long cristaux de bichlorure. Cette réduction se produit spontanément ; elle est très accélérée par la lumière. Le précipité métallique déjà formé peut être enlevé : il suffit de traiter la préparation par la teinture d'iode forte fraîchement préparée et d'enlever ensuite avec soin l'excès d'iode par l'alcool.

On pourra encore utiliser sur le sang frais les solutions alcooliques de sublimé (solution aqueuse saturée de sublimé 2 volumes, alcool à 90° 1 volume) et aussi les mélanges bichromate-sublimé, bichromate-sublimé-formol, bichromate-sublimé iodé, formol-sublimé iodé, fixateurs précieux dont l'étude trouvera mieux sa place à propos de la fixation du sang dans les tissus.

Fixation du sang par sédimentation. — Dans la méthode précédente, l'adhérence de la couche de sang était obtenue par un certain degré de précipitation. Mais il existe de bons fixateurs qui ne coagulent pas le sang, par exemple les solutions de formol et les solutions d'acide osmique. On fait appel à cette propriété en les employant de la façon suivante :

Dans un petit tube à essai on verse une solution d'acide osmique à 1 p. 100. On y laisse tomber ensuite une goutte de sang. Celle-ci forme un nuage brun qui tombe lentement jusqu'au fond du tube. Le sédiment est formé de globules qui, dans leur chute lente, ont eu le temps d'être fixés ; il n'y a pas de précipitation de fibrine. Avec une pipette, on décante la solution d'acide osmique qu'on remplace par de l'eau distillée. Lorsque les globules ont été lavés, on prend avec la pipette une petite goutte de sédiment, on la dépose sur la lame et on l'étale ensuite par un mouvement circulaire excentrique avec l'extrémité fermée et arrondie d'une pipette. On laisse sécher ; la préparation est ensuite colorée.

Pour obtenir l'adhérence du sédiment à la lame, on peut l'enrober dans une solution de celloïdine (2). Dans ce dernier cas, le sédiment est déshydraté dans le

(1) La solution de sublimé est faite à chaud ; en refroidissant, elle dépose des cristaux en aiguille. Les solutions de sublimé légèrement acétifiées sont particulièrement recommandables pour la fixation de l'hémolymphe de la plupart des Invertébrés.

(2) Barjon et Regaud, *Soc. de Biologie*, 14 novembre 1903 et *Soc. méd. des H. de Lyon*, 3 novembre 1903.

tube même par des alcools progressifs, traité par l'alcool absolu et l'alcool-éther et finalement inclus dans une solution très légèrement sirupeuse de celloïdine qu'on étend ensuite sur la lame en couche mince. Les globules adhèrent par la celloïdine en se maintenant suspendus comme dans le plasma.

Les préparations obtenues par sédimentation dans la solution osmique sont difficilement colorables. On peut employer de la même façon les solutions de formol (1). On utilise le liquide suivant, fraîchement préparé :

Solution d'aldéhyde formique à 40 p. 100 . . .	10 volumes.
Solution NaCl à 8 p. 1.000	90 —

Le sédiment est traité comme précédemment, soit desséché sur lame, soit inclus dans une solution de celloïdine. Ces préparations se colorent facilement.

Certaines solutions salines conservent les hématies et permettent leur sédimentation ; mais elles ne sont pas fixatrices ; on peut y ajouter en petite quantité un fixateur comme le formol ; on obtient alors d'excellents liquides conservateurs, utilisés surtout pour la numération des hématies (voir ch. II).

La centrifugation a été souvent employée pour hâter la sédimentation. Elle n'est pas nécessaire aux recherches histologiques ; mais elle est employée avec avantage pour séparer du sang les globulins et les leucocytes dont on veut étudier les propriétés (voir ch. VIII).

Fixation du sang dans les vaisseaux. Fixation de segments vasculaires. — On choisit de préférence une veine d'un diamètre assez petit pour que la pénétration du fixateur se fasse rapidement. La veine jugulaire superficielle du cobaye et du rat, la veine fémorale du lapin, etc., ont des dimensions convenables. Après incision de la peau, on dénude doucement le vaisseau avec les mors rapprochés d'une pince courbe ; on passe 2 fils à 1 centimètre de distance et on lie. On sectionne en dehors des ligatures et on porte dans le fixateur en ayant soin de ne pas toucher avec la pince le segment recueilli. Si l'on doit conserver l'animal, on place 4 fils et l'on sectionne à chaque bout entre deux ligatures. On traite le segment vasculaire comme un fragment de tissu ; on fixe environ 4 heures dans un mélange bichromate-sublimé-formol. L'inclusion de choix est la celloïdine.

Fixation des membranes vasculaires. — Par leur transparence, les membranes se prêtent admirablement aux observations microscopiques ; elles ont été un des principaux objets d'étude en histologie à une époque où l'on ne possédait pas de bonnes méthodes pour confectionner les coupes. Aujourd'hui encore, elles sont précieuses, parce qu'elles permettent d'examiner en place, beaucoup d'éléments anatomiques. On peut y observer le sang vivant et on peut l'y fixer *in situ*.

Chez les Mammifères, un des meilleurs objets est l'épiploon du lapin : c'est une membrane mince, large, facile à manier et favorable à l'observation. On sacrifie un lapin par section du bulbe ou par un choc sur la nuque ; on fend d'abord la peau du ventre et on la sépare de la couche musculaire ; on ouvre ensuite la cavité abdominale. Au-dessus de la masse intestinale on aperçoit l'épiploon, souvent ramassé au bord inférieur de l'estomac. On l'attire avec une pince,

(1) MARCANO, *Soc. de Biologie*, 31 mars 1900.

avec précaution, et on le sectionne. Il peut être utile, pour étaler la membrane sur la lame, de la faire flotter un instant dans un liquide conservateur (solution de chlorure de sodium à 8 p. 1.000). Mais ce traitement préalable n'est pas indifférent pour les cellules sanguines. Il est plus sûr de porter directement sur la lame, avec la pince, et sans y mettre les doigts, un coin de la membrane, d'étaler rapidement une partie bien transparente et peu graisseuse avec la pointe d'une aiguille sans perdre du temps à étaler les petits plis, sans exercer de tractions et sans laisser se produire la moindre dessiccation. On débarrasse rapidement d'un ou deux coups de ciseaux le fragment recueilli des parties adjacentes devenues inutiles, et, posant la lame à plat sur un support, on verse doucement le réactif fixateur. Si, au bout d'une ou deux minutes, on juge que la membrane adhère bien à la lame, on peut porter celle-ci verticalement dans un vase contenant le fixateur ; si la membrane a tendance à se détacher, on achève la fixation en laissant la lame à plat.

Pour la fixation des membranes, on pourra employer l'alcool absolu, les solutions d'acide osmique, les mélanges chromo-osmiques, les solutions de sublimé indiquées plus haut, et surtout les mélanges bichromate-sublimé, bichromate-sublimé-iode et bichromate-sublimé-formol. Le temps de fixation varie naturellement suivant le réactif ou suivant l'épaisseur de la membrane. Pour l'épiploon du lapin, 15 minutes suffisent avec les réactifs cités.

Il n'est pas nécessaire que la membrane adhère à la lame. Il ne faut pas chercher à la tendre, à l'étirer, à la fixer sur les bords par demi-dessiccation ; toutes ces manœuvres produisent des altérations. Si la membrane adhère à la lame, on la traite comme une coupe collée et l'on transporte la lame successivement dans les différents réactifs. Si la membrane n'adhère pas, on fait en sorte que le fragment n'ait pas plus de 1 centimètre et demi de côté et avec une spatule plate, on le transporte dans les liquides successifs : eau, alcool iodé, eau, solutions colorantes, etc., préparés à l'avance dans de petits cristallisoirs. En multipliant les solutions alcooliques intermédiaires, la réaction se fait régulièrement. On traite ainsi la membrane comme une coupe non collée.

Il peut être nécessaire parfois de fixer la membrane dans un état de parfaite extension. Nous supposerons qu'il s'agit du mésentère d'un lapin on d'un jeune chat. La cavité abdominale étant ouverte, on attire au dehors une anse d'intestin, et sous le mésentère on applique la surface plane d'un large bouchon de liège ; la membrane est fixée par un lien circulaire sur le bouchon comme la peau d'un tambour, et l'intestin est réséqué. On immerge dans le fixateur et on n'enlève la membrane que lorsqu'elle a pris un degré de rigidité convenable. On peut aussi se servir pour cette opération d'un anneau de liège sur la face externe duquel on a ménagé une petite rainure qui facilite l'application du lien circulaire. On peut aussi étendre la membrane sur la face inférieure du bouchon de verre d'un flacon à large encolure, bouchon qu'on a retourné. Le flacon, a moitié rempli du fixateur, est ensuite bouché; la membrane se trouve maintenue en extension et le flacon est retourné pour que la solution fixatrice agisse sur la membrane. On peut utiliser de la même manière un flacon bouché au liège. On peut enfin épingler la membrane sur un liège avec des piquants de hérisson.

Il existe chez les Batraciens des membranes extrêmement minces : ce sont celles qui limitent certains sacs lymphatiques. Deux surtout sont à retenir : celles qui limitent le sac retro-lingual et le sac péri-œsophagien. Cette dernière, appelée

membrane péri-œsophagienne, est un objet de choix (1). Elle entoure l'œsophage auquel elle n'adhère qu'en un point de son pourtour. Pour la mettre en évidence, on choisit une grosse grenouille verte, et on l'immobilise en lui détruisant la moelle épinière. Ayant placé l'animal sur le dos, on fend l'abdomen sur la ligne médiane. On aperçoit tout de suite l'estomac. On découpe le plastron sternal et on met le cœur à nu en ayant soin de ne pas répandre de sang. Soulevant alors le cœur, on aperçoit l'œsophage. La membrane est appliquée sur lui ; mais elle n'est pas visible. Pour la faire apparaître, il faut injecter le sac qu'elle limite. Avec une seringue dont l'aiguille pique très superficiellement l'œsophage, on injecte quelques gouttes d'une solution d'acide osmique à 1 p. 100 ; le sac se gonfle du liquide ; on aperçoit la membrane. On sectionne alors l'œsophage en haut et en bas et on le transporte, avec la membrane qui l'entoure, sur une lame, dans une goutte de la solution osmiquée. Avec la pointe d'une aiguille, on isole la membrane, on la détache d'un coup de ciseau et on achève la fixation. Quand on connaît bien la situation de la membrane, il n'est pas nécessaire de gonfler le sac. On recueille l'œsophage et sur la lame, dans une goutte de lymphe péritonéale ou péricardique recueillie à l'avance dans une pipette, on isole la membrane ; on la fixe ensuite comme précédemment. Un mélange bichromate-sublimé-formol agissant pendant 15 minutes donnera d'excellents résultats.

Le poumon et la vessie de la grenouille fournissent de bonnes préparations de réseaux vasculaires. Mais la paroi de ces organes contient des fibres musculaires lisses contre la contraction desquelles il faut lutter. On les fixera donc en les gonflant du liquide fixateur. Voici comment on opérera pour la vessie : on immobilise une grenouille par destruction de la moelle épinière ; on incise la paroi abdominale, puis, plaçant l'animal la tête vers l'observateur, on cherche le rectum, on l'incise et on y introduit une grosse canule. On lie le rectum sur la canule. On fait d'abord passer avec une seringue de l'eau salée à 7 p. 1.000 pour débarrasser la vessie de ses impuretés ; puis, attirant la peau de l'anus, on y place une ligature serrée qui obture absolument l'orifice. On injecte alors le liquide fixateur. Lorsque la vessie est gonflée, on la lie à sa base et on la détache avec précaution en sectionnant au-dessous de la ligature. On la transporte toute gonflée dans le réactif où s'achève la fixation. Lorsque celle-ci est produite (il faut 1 à 2 heures), on ouvre l'organe et on le découpe en quelques fragments qu'on traite comme il a été dit précédemment.

C'est un procédé analogue qu'on emploie pour la fixation des poumons. La grenouille étant immobilisée, on fend toute la paroi du corps et on enlève le sternum, mettant à nu le cœur. Par la bouche entr'ouverte, on introduit l'extrémité d'une canule dans la glotte et on la fait pénétrer dans un des poumons. On lie la base du poumon sur la canule et on injecte le réactif fixateur. Lorsque le sac pulmonaire est gonflé, on place une ligature devant le bec de la canule ; on détache l'organe, on le porte dans le réactif et on le traite comme précédemment. La plupart des réactifs fixateurs attaquent les canules métalliques. Le mieux est de se servir pour ces expériences de canules de verre qu'on a fabriquées soi-même et qu'on adapte, à l'aide d'un tube en caoutchouc, à l'embout d'une seringue de verre.

La membrane hyaloïde de la grenouille, la mésentère et le poumon du triton et de l'axolotl, l'expansion membraneuse de la queue des larves de batraciens et même des membranes plus épaisses, comme la paroi intestinale de la grenouille,

(1) Ranvier, *C. R. Ac. des sc.*, 8 décembre 1890.

le centre phrénique du rat et de la souris, etc., pourront être utilisés. On imaginera facilement, pour ces différents objets, les variantes des procédés techniques que nous avons indiqués. Enfin, le sac vitellin de l'œuf en voie de développement des Oiseaux et des Mammifères est parmi les plus beaux objets qu'on puisse trouver pour l'étude du sang (voir ch. x).

FIXATION DES TISSUS HÉMATOPOIÉTIQUES

Les méthodes que nous allons décrire ont surtout en vue l'étude des tissus et des organes hématopoiétiques, mais elles s'appliquent aussi à l'étude du sang dans les tissus.

Les tissus qui contiennent des cellules sanguines en formation sont le plus souvent des tissus mous, dans lesquels les cellules libres sont supportées par une trame lâche. Il est donc facile, soit en dissociant un petit fragment, soit en l'exprimant doucement dans une goutte de fixateur, d'obtenir un grand nombre de cellules libres.

Dissociation. — Cette méthode peut d'abord être appliquée à l'étude des éléments frais et vivants. On recueille, sur un cobaye qui vient d'être sacrifié, un fragment minuscule de moelle rouge du fémur ; on le dépose sur la lame dans une goutte de sérosité péritonéale ou mieux de sérum sanguin du même animal ; on le dissocie avec deux aiguilles ; on recouvre d'une lamelle qui repose sur deux cales de paraffine. On peut observer ainsi les éléments frais et vivants (voir ch. xii). On peut aussi s'adresser à de véritables réactifs dissociateurs. Un minuscule fragment de moelle osseuse ou de rate n'ayant pas plus de 1 à 2 millimètres de côté, est placé dans l'acide chromique à 2/10.000 ou de bichromate de potasse à 2/1.000 où il séjourne 24 heures. Après lavage dans l'eau distillée, on porte le fragment sur une lame dans une goutte d'eau distillée et on dissocie rapidement avec des aiguilles. On applique la lamelle et on fait passer sous la lamelle une goutte d'une solution colorante glycérinée. Mais cette méthode ne donne que des renseignements superficiels et n'est applicable qu'à des cas particuliers.

Méthode des empreintes. — On prend dans les mors d'une pince, un petit fragment de la moelle rouge pulpeuse qui se trouve dans le fémur du cobaye (1). Sur une lame bien propre, on fait, avec le fragment quelques taches ou *empreintes*. Chaque contact du fragment avec la lame y dépose un certain nombre de cellules. Il faut appuyer peu et opérer rapidement pour éviter la dessiccation. On fixe la préparation, soit en l'exposant aux vapeurs osmiques 30 à 60 secondes, soit en immergeant 10 à 15 minutes dans un mélange chromo-osmique, dans une solution de sublimé saturé ou dans un mélange bichromate-formol, bichromate-sublimé iodé (voir plus loin). On traite la préparation comme une préparation de sang frais. Après les vapeurs osmiques ou les mé-

(1) Le fragment peut être tenu avec l'extrémité effilée et sectionnée d'une pipette. La moelle très fluide des os des embryons et des jeunes animaux est exprimée ou aspirée avec une pipette. Suivant la consistance, on fait des empreintes ou de petits étalements sans frotter.

langes chromo-osmiques, on lave à l'eau distillée; après les mélanges bichromate-sublimé-formol, on lave à l'eau distillée, puis à l'alcool iodé ; après les solutions de sublimé, on lave à l'alcool à 70° iodé. Le centre de chaque empreinte est trop épais pour l'observation et se détache du reste dans les lavages ; mais sur les bords, là où les cellules ont adhéré en couche mince, la fixation est excellente. La méthode des empreintes, très précieuse, est due à *Malassez* (1) ; elle est très distincte de la méthode des frottis, qui lésant brutalement les éléments anatomiques, n'est guère applicable qu'à la recherche des micro-organismes ou à certaines réactions micro-chimiques.

Mais la méthode des empreintes ne permet pas d'étudier les éléments avec leurs véritables connexions. Il faut s'adresser à la méthode des coupes.

Méthode des coupes. — Les tissus hématopoiétiques sont des tissus difficiles à fixer parce que l'hémoglobine des hématies est altérée par un grand nombre de réactifs fixateurs. Ces tissus contiennent des globulds rouges jeunes, peu riches en hémoglobine et dans lesquels le pigment sanguin est très fragile. Il faut utiliser des réactifs qui fixent à la fois les noyaux et l'hémoglobine.

Les fragments du tissu à fixer doivent être recueillis absolument frais, sur l'animal qu'on vient de sacrifier, et avec les précautions les plus minutieuses pour ne leur faire subir ni pressions, ni tiraillements. Avec un rasoir, et suivant une orientation convenable (2), on enlève des tranches extrêmement minces, qui ne doivent pas avoir plus de 1 à 2 mm. d'épaisseur. Si ces tranches sont très minces et un peu larges, elles ont une tendance à se déformer. On prévient cette déformation de la façon suivante : la coupe est recueillie à la surface d'un bouchon compact et bien lisse sur lequel elle s'étale régulièrement. On verse quelques gouttes du réactif fixateur et, lorsque la pièce a pris un peu de consistance, on la porte avec précautions dans le liquide, en renversant le bouchon. On peut aussi appliquer la tranche mince du tissu à fixer sur le fond d'une soucoupe, verser le réactif fixateur par dessus ; lorsqu'elle a pris une consistance suffisante, on la fait flotter, et on laisse la fixation s'achever.

Si le tissu est trop mou pour qu'on puisse avec le rasoir y prélever de minces tranches, on découpe un fragment plus gros que l'on recoupe après un début de durcissement. On peut aussi y prélever, avec de fins ciseaux, un minuscule fragment. On peut enfin fixer dans le réactif des gouttelettes de moelle fluide que l'on fait sourdre, en exprimant doucement un os spongieux entre les mors d'une pince (3).

Le sublimé acétique (4), le bichromate acétique (5), le mélange bichromate-su-

(1) Malassez, *Archives de Physiologie*, 1882.

(2) Transversale au grand axe le plus souvent dans la rate, les ganglions, la moelle diaphysaire. Voir chap. XII, XIII, XIV.

Chez l'homme, les opérations chirurgicales (amputations, splénectomies pour traumatismes, etc.) fourniront souvent l'occasion de fixer les tissus hématopoiétiques dans d'excellentes conditions. Dans les autopsies, la moelle osseuse des côtes et du sternum sera atteinte facilement et elle pourra souvent être fixée avant toute altération.

(3) Une méthode analogue a été employée, dans des cas exceptionnels, pour le sang liquide. La goutte est fixée par un réactif fixateur coagulant, incluse et débitée en coupes.

(4) Sublimé saturé auquel on ajoute 2 à 5 p. 100 d'acide acétique.

(5) Connu sous le nom de liquide de Tellyesniczky ou de Telly. Solution de bichromate de potasse à 3 p. 100 à laquelle on ajoute 3 à 5 p. 100 d'acide acétique.

blimé acétique (1) sont d'excellents fixateurs généraux, qui rendront des services dans l'étude des tissus hématopoiétiques ; mais ils fixent imparfaitement l'hémoglobine et les granulations leucocytaires. Si on veut les employer, il faut donc réduire la quantité d'acide acétique. Il en est de même des mélanges chromo-osmio-acétiques (2). On pourra employer la solution recommandée plus haut pour le sang et pour les frottis (3).

Les solutions de formol fixent bien l'hémoglobine. Employées seules, elles pourront rendre des services pour la fixation de fragments volumineux. On emploiera par exemple, la solution suivante :

Aldéhyde formique à 40 p. 100	10 vol.
Solution de chlorure de sodium à 8 p. 1.000	90 —

On fixera au moins 48 heures et plusieurs jours même, suivant l'épaisseur des morceaux et on placera ensuite l'objet fixé dans l'alcool à 60°. On utilisera aussi avec profit le mélange des solutions de formol et de sublimé (4), par exemple la solution suivante :

Aldéhyde formique à 40 p. 100	10 vol.
Solution de sublimé à 3 p. 100 dans l'eau salée à 8 p. 1.000.	90 —

Dans ce cas, on prendra de minces fragments et la fixation ne sera pas poussée au delà de 4 à 5 heures. On utilisera de même avec profit la solution saturée de sublimé employée seule. On fixe 4 à 5 heures des fragments d'environ 2 millimètres d'épaisseur et on transporte l'objet directement dans l'alcool à 70° iodé.

L'addition de formol aux solutions de sublimé et de bichromate permet d'obtenir des mélanges fixateurs excellents, conservant parfaitement l'hémoglobine et les granulations leucocytaires ; aussi allons-nous indiquer leur emploi avec quelques détails (5).

Mélanges bichromate-sublimé-formol (6). — A 50 cc. d'une solution de sublimé à 5 p. 100, on ajoute 50 cc. d'une solution de bichromate de potasse à 5 p. 100 et, seulement au moment de s'en servir, 5 à 10 cc. de formol du commerce (7). Ce

(1) Solution de sublimé à 5 p. 100 et solution de bichromate à 5 p. 100 mélangés à parties égales. On ajoute, au moment de s'en servir, 3 à 5 p. 100 d'acide acétique. Connu sous le nom de liquide de Zenker.

(2) Connus sous le nom de liquide de Flemming.

(3) Solution d'acide chromique à 1 p. 100 dans l'eau distillée : 30 v.
Solution d'acide osmique à 1 p. 100 — — 10 v.
Acide acétique 1 goutte.

(4) Voir Weidenreich, Ergebnisse der Anatomie, 1911. Dans certains cas particuliers on pourra avoir recours aux solutions alcooliques de sublimé recommandées par Schaudinn.

(5) Ces mélanges ont été parfois critiqués comme irrationnels à cause des réactions chimiques qui se passent entre les corps en présence, en particulier, à cause de l'action réductrice du formol. Mais cette critique est toute théorique et n'enlève rien aux excellents résultats donnés par ces réactifs. Il suffit, pour éviter les inconvénients dus à leur instabilité, de les préparer au moment de s'en servir.

(6) Helly, *Zeitschrift f. wiss. Mikroskopie*, XX, 1903, et *Ziegler's Beiträge*, XXXVII, 1905. Ce mélange est en somme du liquide de Zenker auquel on ajoute, au lieu d'acide acétique, 5 p. 100 de formol du commerce.

(7) Pour la coloration des centrosomes, des mitochondries, etc., on peut ajouter 2 à 5 centimètres cubes d'acide osmique à 1 p. 100. Voir aussi Maximoff, *Zeitschrift f. wiss Mikroskopie*, XXVI, 1909.

mélange est un fixateur parfait des tissus hématopoiétiques. On fixe environ 5 heures des fragments de 2 millimètres d'épaisseur. On lave dans l'eau, d'abord, pour enlever l'excès de bichromate, puis dans l'alcool à 70° iodé pour enlever l'excès de sublimé. Cette fixation permet d'excellentes colorations.

Les mélanges bichromate-formol sans sublimé ont à peu près le même pouvoir de fixation que les précédents, mais on doit les réserver à des cas spéciaux; ils permettent les colorations diverses à l'hématoxyline, mais les bleus basiques donnent ici de moins bons résultats.

Mélanges au sublimé iodé. — Ces mélanges ont été imaginés par *Dominici* pour la recherche des globules rouges nucléés dans les tissus (1). Ils sont excellents. On fait chauffer doucement dans une petite capsule de porcelaine 10 cc. environ d'une solution saturée de sublimé dans l'eau distillée. Lorsque le liquide est à une température voisine de 40°, on cesse de chauffer et on ajoute goutte à goutte de la teinture d'iode récemment préparée en dissolvant des cristaux d'iode dans dix fois leur poids environ d'alcool à 90°. Une partie de l'iode est volatilisée, mais une autre partie forme avec le sublimé un composé instable d'iodo-chlorure de mercure. On continue à ajouter de la teinture d'iode goutte à goutte jusqu'à ce que l'iode commence à se précipiter. La liqueur, à ce moment, a une teinte madère; elle doit être absolument transparente. On y ajoute un volume égal d'une solution de bichromate de potasse à 2,5 p. 100 dans l'eau distillée. Elle doit être employée immédiatement et ne se conserve pas. Une bonne précaution est de l'employer légèrement chaude, à une température de 30°. On immerge des fragments très petits ou des tranches de tissus extrêmement minces, ne dépassant pas 1 millimètre d'épaisseur, car le liquide a un faible pouvoir de pénétration. On laisse au contact environ 4 à 5 heures (2). On lave à l'eau distillée et à l'alcool iodé.

On peut remplacer la solution de bichromate par une égale quantité d'une solution de formol du commerce à 10 p. 100, qui rend le mélange plus pénétrant (3).

Les mélanges au sublimé-iodé fixent parfaitement les cellules hémoglobiques dans les tissus. Ils permettent d'excellentes colorations. L'iode agit dans ces liquides autant comme mordant que comme fixateur. Il est probable que la petite quantité d'iode libre qui se dégage lentement n'est pas indifférente à cette action C'est ce qui explique que les bons effets de ces fixateurs ne se font sentir qu'à une faible profondeur C'est pourquoi il y a toujours intérêt à recueillir des fragments très minces qu'on fixera dans le minimum de temps, sauf dans les cas spéciaux où l'on voudra, en prolongeant l'action du réactif, l'utiliser comme mordant.

Les méthodes de fixation que nous avons indiquées concernent surtout la recherche et l'étude des cellules sanguines. Mais, pour faire une étude complète des tissus hématopoiétiques, il faut, bien entendu, s'adresser à toutes les méthodes histologiques nécessaires pour étudier leur charpente, leurs vaisseaux, leurs

(1) Dominici, *Soc. de Biologie*, 22 février 1902.

(2) Le temps de fixation peut être réduit avec avantage pour les fragments d'une épaisseur moindre. Il en est de même pour le cas de la fixation des membranes.

(3) On peut aussi faire ce mélange de la façon suivante : A 100 centimètres cubes d'une solution de sublimé saturée, on ajoute 10 à 15 centimètres cubes de formol du commerce ; puis, goutte à goutte, de la teinture d'iode à 1/10 jusqu'à ce que le liquide prenne une teinte madère et en s'arrêtant avant le début de la précipitation de l'iode (voir Rubens Duval, in Gilbert et Weinberg, Traité du Sang).

nerfs, méthodes d'injection, d'imprégnation, etc. L'application de ces techniques particulières sera examinée à propos des organes hématopoiétiques.

Traitement des tissus fixés. — Dans le fixateur, les tissus lymphoïdes ont acquis une plus grande fragilité ; aussi faut-il les manier avec une petite spatule et non avec des pinces lorsqu'on les transporte d'un liquide dans un autre ; l'emploi d'une spatule est indispensable lorsqu'il s'agit de pièces délicates comme des fragments de moelle osseuse ou d'embryons.

Après l'action de la plupart des fixateurs, de l'acide osmique, des bichromates alcalins, de l'acide chromique, on lave à l'eau. On peut laver à l'eau courante dans un flacon laveur ; mais, comme il s'agit en général de tissus friables, il vaut mieux laver par immersion dans l'eau distillée, pendant vingt-quatre heures. On emploie une assez grande quantité d'eau distillée, qu'on renouvelle plusieurs fois si c'est nécessaire ; il faut se servir d'eau distillée, car l'eau de source, dans ces conditions, dépose des sels calcaires à la surface de la pièce.

Après l'action des solutions de sublimé avec ou sans acide acétique, on traite directement par l'alcool à 70° iodé. L'alcool dissout le sublimé. L'iode forme avec l'excès de bichlorure des iodo-chlorures plus solubles. Si l'alcool iodé s'est décoloré, on rajoute de la teinture ; il faut qu'il en reste toujours un excès dans le flacon ; on met celui-ci à l'abri de la lumière. Si tout le sublimé n'a pas été dissous, le mercure se précipite graduellement dans la pièce sous forme de grains noirs de mercure métallique oxydé ; on peut les faire disparaître en traitant les coupes par la teinture d'iode au 1/10 et en enlevant ensuite l'excès d'iode par l'alcool.

Après l'action des mélanges contenant à la fois du bichromate et du sublimé, on traite successivement par l'eau distillée et par l'alcool iodé. Après les mélanges bichromate-formol, on traite successivement par l'eau distillée et par l'alcool à 70°. Après l'action des solutions de formol, on traite par l'alcool à 70° directement.

Inclusion des fragments. — Pour les débiter en coupes transparentes, il faut inclure les fragments dans des milieux de consistance appropriée qui permettent d'y pratiquer des coupes très minces. Toute méthode d'inclusion comprend les opérations suivantes : 1° imbiber la pièce par un dissolvant de la substance choisie pour l'inclusion (par exemple, eau pour la gomme et la gélatine, alcool-éther pour le collodion, essence pour la paraffine, etc.) ; 2° faire pénétrer la substance d'inclusion dans le tissu, à l'état de dissolution ; 3° la solidifier par coagulation (gomme), évaporation (collodion) ou refroidissement (paraffine, gélatine).

On n'utilise guère aujourd'hui que deux méthodes d'inclusion : la celloïdine et la paraffine. Elles suffisent à presque tous les cas (1).

Le collodion (2) (ou la celloïdine) permet une inclusion à froid, lente, n'altérant pas les pièces. On peut obtenir facilement, sans le moindre tassement, des coupes

(1) L'inclusion à la gomme ne s'applique qu'à des cas très exceptionnels, pour les tissus qui ne peuvent supporter la déshydratation par l'alcool.

(2) Pour le mode d'emploi des méthodes d'inclusion, je renvoie aux traités techniques d'histologie. La méthode d'inclusion au collodion ou à la celloïdine a été parfois critiquée, bien à tort, car elle est excellente. En dehors de l'étude de l'hématopoièse, il est certaines recherches (os, système nerveux, œil, etc.) où elle est indispensable.

très larges. La transparence du bloc est aussi un avantage précieux qui permet des orientations très exactes et qu'on mettra à profit lorsqu'il s'agira de couper la pièce suivant un plan bien déterminé (coupe axiale sagittale d'un embryon, coupe d'un os long en voie de développement, etc.) ou de varier l'orientation au cours de l'opération (recherches topographiques, pièces injectées, etc.). Cette méthode, mieux que la paraffine, permet d'obtenir de bonnes coupes de tissus durs, ou de tissus contenant des parties dures à côté de parties molles (os) ; elle est indispensable pour l'étude de la moelle osseuse en place. Elle donne de fort bons résultats pour l'étude du tissu conjonctif, du mésenchyme et de l'hématopoièse, surtout chez les embryons. Avec des tissus mous, elle permet des coupes très minces.

Un des inconvénients de la méthode du collodion, c'est la difficulté d'obtenir des séries. Quand celles-ci sont nécessaires, il faut recevoir les coupes dans des godets séparés, les traiter et les monter les unes après les autres. Il existe cependant des méthodes qui permettent de coller une série de coupes sur la même lame, qu'on colore ensuite comme on le fait avec l'inclusion à la paraffine. La plus simple consiste à disposer une à une les coupes sur la lame, avec un pinceau, à sécher l'alcool en pressant légèrement au buvard sans déranger les coupes et à verser ensuite sur elles une solution très faible de celloïdine qu'on coagule par demi-dessiccation, puis par l'alcool à 70°. La lame, revêtue de sa série des coupes, est colorée et maniée ensuite facilement. Ce procédé a reçu de nombreuses variantes (1).

On peut aussi coller les coupes sur lame, par l'albumine. La lame bien propre est enduite du mélange albumine-glycérine (albumine 2 p., glycérine 1 p.). Les coupes sont portées de l'alcool à 80° dans l'alcool à 60°-65°. Elles sont placées, au sortir de l'alcool à 60°-65°, en série, sur la lame, au pinceau, puis pressées au buvard, jusqu'à demi-dessiccation. On verse alors sur les coupes de l'essence de girofle qu'on laisse jusqu'à éclaircissement (5 à 10 minutes). L'excès d'essence est alors versé sur une autre lame. On immerge la lame dans l'alcool à 95°, puis dans l'alcool absolu jusqu'à dissolution complète de la celloïdine (5 à 10 minutes). On passe ensuite dans l'alcool à 70-80° les coupes qui ont été conservées jusqu'au moment de la coloration. On porte ensuite dans l'eau, puis dans le bain colorant (2).

Les nombreuses variantes qui ont été apportées à la méthode du collodion n'ont pas un grand intérêt. Dans des cas exceptionnels cependant, la pénétration des blocs par l'essence de cèdre et la double inclusion à la celloïdine et à la paraffine pourront être utilisées avec profit (3).

L'inclusion à la paraffine est une méthode plus simple, plus rapide, qui permet d'obtenir de longues séries de coupes minces. Elle donne de bons résultats avec les tissus hématopoiétiques qui sont généralement mous et bien pénétrables. Le choix de la paraffine a une grande importance ; elle ne doit être ni cassante, ni cristalline, ni suintante ; sa surface de section doit présenter un aspect homogène ; c'est ce que montrent les paraffines recuites. Le choix du dissolvant variera sui-

(1) Weigert, *Zeitschrift f. wiss. Mikr.*, 1885. — Auburtin, *An. Anzeiger*, 1897.

(2) Rubaschkin, *An. Anzeiger*, XXXI, 1907. — Dantschakoff, *Zeitschrift f. wiss. Mikroscopie*, XXV, 1908. — Maximow, *Zeitschrift f. wiss. Mikroscopie*, XXVI, 1909.

(3) Voir, pour ces méthodes, les Traités de technique histologique et en particulier : Bolles Lee et Henneguy, Traité des méthodes techniques de l'Anatomie microscopique. — Neumayer, Celloidin in *Encyclopédie technique d'Ehrlich*. Pour les méthodes de décalcification, voir chap. XII.

vant les circonstances ; bien maniés, le xylol, le toluène, communément employés, donneront de bons résultats et suffiront à presque tous les cas. Le temps capital de l'inclusion est la déshydratation par les alcools ; elle doit être progressive et complète. La durée du séjour dans le bain de paraffine varie beaucoup suivant les tissus. Pour des fragments très petits de tissus mous (moelle osseuse, rate, embryons, etc.) la pénétration peut être complète en quelques heures. Mais contrairement à ce que l'on croit souvent, ce n'est presque jamais le séjour prolongé dans la paraffine chaude qui altère les tissus, à condition, bien entendu, de ne pas dépasser 56°. Ce qui altère surtout les éléments c'est la pénétration insuffisante dans les essences, le refroidissement prématuré de la paraffine avant pénétration complète, et toutes les causes de desséchement et de production de courants de diffusion trop brusques.

L'inclusion à la paraffine ne peut naturellement être utilisée dans les cas où l'on veut conserver certaines substances qui sont solubles dans les essences. On peut chercher alors des solvants de la paraffine qui ménagent ces substances. C'est dans ces cas que l'on pourra s'adresser parfois avec avantage à l'huile de cèdre (essence de cèdre épaissie) ; c'est un excellent procédé d'inclusion pour les objets délicats.

MÉTHODES DE COLORATION

Les principes généraux de la coloration s'appliquent également aux préparations de sang étalé sur lame, aux empreintes de tissu lymphoïde et aux coupes.

Les tissus frais ou vivants ne montrent au microscope que très peu de détails de structure. Les fixateurs, en produisant des différences de réfringence, font déjà apparaître quelques détails qui ne deviennent bien nets que par l'action des matières colorantes.

Le *carmin* est peu utilisé dans l'étude du sang et des tissus hémopoiétiques. On l'emploie pour les masses à injections, surtout pour les injections doubles. Le picrocarminate d'ammoniaque de Ranvier n'est plus guère employé que dans les préparations extemporanées montées dans la glycérine. Le carmin aluné rendra parfois de grands services comme colorant nucléaire dans les préparations dont les vaisseaux ont été injectés au bleu de Prusse ou dans lesquelles le tissu conjonctif a été coloré électivement avec les colorants plasmatiques bleus.

L'*hématoxyline* est au contraire extrêmement employée dans l'étude du sang. C'est le meilleur et le plus puissant colorant des noyaux et des structures cellulaires. Cette substance intervient dans beaucoup de colorations simples ou combinées. On emploie généralement une solution d'hématéine qui est préparée de la façon suivante :

Dans un mortier de verre on broie 1 gramme d'hématéine dans 25 cc. d'alcool absolu, jusqu'à ce que l'alcool ait absorbé la plus grande partie du colorant. D'autre part, on fait dissoudre à chaud, dans une capsule de porcelaine bien propre, 25 grammes d'alun d'ammoniaque cristallisé dans 500 cc. d'eau distillée. A la solution chaude, on ajoute, goutte à goutte, la solution alcoolique d'hématéine ; la liqueur prend une belle couleur bleu-violet. Cette solution peut être

employée immédiatement, mais elle n'acquiert son pouvoir colorant maximum qu'au bout de quelques jours. Au bout de deux ou trois mois, elle s'altère et vire au rouge lie de vin ; sous cette forme, elle garde ses propriétés tinctoriales, mais elle ne colore plus électivement les noyaux.

Les *couleurs d'aniline* employées en technique histologique sont extrêmement nombreuses. Nous ne parlerons ici que de celles qui sont utiles à l'étude du sang et des tissus hémopoiétiques. Suivant leurs affinités, elles peuvent être divisées en *colorants nucléaires* et *colorants plasmatiques*. Ces colorants sont souvent désignés sous les noms de *colorants basiques* et de *colorants acides* (1). Les couleurs acides sont les sels des acides colorés ; les couleurs basiques sont les sels des bases colorées. Autrement dit, suivant que c'est l'acide ou la base qui apporte la coloration, la couleur, qui a la constitution chimique d'un sel (2) est appelée acide ou basique. D'une manière générale, les couleurs basiques sont des colorants nucléaires et les couleurs acides des colorants plasmatiques. Mais cette classification n'a rien d'absolu. Des colorants acides peuvent, dans certaines conditions, colorer les noyaux, et la plupart des couleurs basiques colorent plus ou moins le cytoplasme. L'emploi des mordants peut, comme nous le verrons, modifier complètement ces affinités.

Parmi les couleurs d'aniline *nucléaires*, il faut citer : les bleus de méthylène, la thionine, la toluidine, très voisine et plus énergique, les violets de méthyle, le violet de gentiane, la fuchsine basique, la safranine, le vert de méthyle, etc.

Parmi les couleurs *plasmatiques :* les éosines et érythrosines, l'orange, l'aurantia, le violet acide, le vert acide, la fuchsine acide, les bleus de méthyle et les bleus d'aniline, etc.

Les couleurs d'aniline sont employées en solutions aqueuses, glycérinées ou hydro-alcooliques. Les solutions alcooliques ont un pouvoir colorant moindre que les solutions aqueuses. L'addition de glycérine aux solutions aqueuses augmente souvent leur pouvoir colorant.

A côté des colorants acides ou basiques, *Ehrlich* a distingué des *colorants neutres* résultant du mélange de couleurs basiques et de couleurs acides (3). Dans ces mélanges, la couleur basique est considérée théoriquement comme neutralisant la couleur acide. Il semble en effet qu'il se forme ici de nouveaux corps. C'est ce qui se passe dans les mélanges de solutions d'éosine et de bleu de méthylène où les composés nouvellement apparus ont des propriétés tinctoriales particulières. Ils se précipitent dans le mélange des deux solutions aqueuses, car ils sont insolubles dans l'eau. Mais ils se redissolvent dans un excès de colorant acide ou dans un excès de colorant basique. On emploie généralement pour les dissoudre l'alcool méthylique.

Colorations simples. Colorations combinées. — Les matières colorantes peuvent être employées seules. Presque toujours on associe leurs effets, en employant, par exemple, une couleur nucléaire bleue et une couleur plasmatique rouge ou inversement. Ces colorations combinées peuvent être réalisées

(1) Ehrlich, Farbenanalytische Untersuchungen, Berlin, 1891.

(2) Les couleurs d'aniline sont presque toujours employées sous forme de sels, parce qu'à l'état de base colorée ou d'acide coloré elles sont peu solubles.

(3) Ehrlich, Farbenanalytische, I, p. 5 et p. 125. — Rosin, Neutrale Farbstoffe, in *Encyclopédie d'Ehrlich*, II, 1910. — Laurent, *Centralblatt f. path. Anatomie*, XI, 1900. — Langeron, Précis de microscopie, 3e éd., 1920.

par des mélanges ; mais le plus souvent, on fait agir successivement les deux solutions. On ajoute exceptionnellement une troisième couleur.

Métachromasie. — Certaines matières colorantes ont la propriété de donner à elles seules des colorations multiples. Ainsi, certains bleus comme la thionine et la toluidine colorent en vert le corps hémoglobique des globules rouges nucléés, tandis qu'ils teignent en violet leur noyau. La thionine et la toluidine colorent en rouge violacé ou même en rouge vif certaines granulations leucocytaires, le mucus et la substance fondamentale du cartilage ; elles colorent ainsi dans une teinte différente de celle de la solution colorante. Ce phénomène est appelé *métachromasie* (1).

Mordants. — Les mordants sont des subtances qu'on fait agir avant le colorant et qui favorisent ensuite l'action de la teinture. Beaucoup de substances sont susceptibles d'être employées comme mordants : l'iode, soit sous forme de teinture d'iode (au 1 20 ou au 1 50) soit sous forme de solution iodo-iodurée (iode 1 gr., Ki, 2 gr., eau 200), le tannin (en solution aqueuse à 5 p. 100) ; l'alun d'ammoniaque (en solution aqueuse à 5 p. 100), l'acide chromique (en solution aqueuse à 1 p. 1000), le permanganate de potasse (à 1 p. 100), l'huile d'aniline (en solution aqueuse saturée), etc. L'acide phénique, le borate de soude, et surtout le formol, introduits dans certaines solutions à titre de conservateurs, sont aussi des mordants. Ces mordants agissent de différentes façons. Un grand nombre forment avec la couleur des combinaisons colorées insolubles, des *laques* (alun de fer, alun de potasse, alun d'ammoniaque, acétate de cuivre, ferrocyanure de potassium, etc.). D'autres agissent comme oxydants (acide chromique, chromates, bichromates, acide osmique, acide phosphomolybdique, etc.). Beaucoup de mordants de cette catégorie sont en même temps fixateurs des tissus. Certains enfin favorisent les oxydations (huile d'aniline, acide phénique, formol).

Quelques mordants peuvent être employés à la fois comme mordants et comme différenciateurs (acide picrique, tannin).

Colorations progressives. Colorations régressives. — Les solutions colorantes sont employées en coloration progressive ou en coloration régressive. Dans les colorations progressives, on utilise la rapidité plus grande avec laquelle la matière colorante se fixe sur tel élément à l'exclusion des autres ; on arrête la coloration lorsque cet élément est coloré ; c'était la méthode presque uniquement employée autrefois en histologie. Dans les colorations régressives, on surcolore et on décolore ensuite ; on profite ainsi de l'énergie plus ou moins grande avec laquelle les différents éléments retiennent la couleur.

La plupart des colorations dans lesquelles on fait agir un mordant sont des colorations régressives. L'alcool et l'eau ne suffisant plus alors à enlever la couleur, il faut s'adresser à des substances plus énergiques. Le mode d'emploi de ces

(1) Le mécanisme de la métachromasie n'est pas encore complètement élucidé. Certaines colorations métachromatiques paraissent dues à la présence de traces d'une autre matière colorante (violet de méthylène). Il semble cependant que cette propriété puisse appartenir à des colorants chimiquement purs et qu'elle dépende alors du solvant employé (eau, alcool, chloroforme, etc.). Le phénomène s'expliquerait, soit par la dissociation du corps en solution, soit par des modifications survenues dans la disposition de ses groupements atomiques.

décolorants et différenciateurs constitue toute une partie de la technique des colorations histologiques. Après les couleurs d'aniline, on emploie les essences (xylol, toluène, essence de bergamotte, de girofle, etc.), les solutions de tannin, les solutions d'une couleur différente à action décolorante. Après l'hématéine, on décolore par l'alcool à 70° auquel on a ajouté 1 p. 1.000 d'acide chlorhydrique; après l'hématoxyline au fer, on utilise la solution d'alun de fer. L'emploi des décolorants acides exige des tissus parfaitement fixés; l'alcool chlorhydrique ne peut être utilisé que sur les coupes et les empreintes ou sur les lames de sang fixées à l'état frais; il ne peut être employé sur les lames de sang fixées après dessiccation.

Colorations électives. Colorations spécifiques. — Ce sont celles qui colorent certaines parties à l'exclusion des autres. Toutes les colorations histologiques sont, en somme, des colorations électives; mais cette expression s'applique plus spécialement aux méthodes dans lesquelles une substance, une partie de cellule, etc., sera colorée d'une manière exclusive et spécifique : le glycogène par l'iode par exemple, certaines granulations leucocytaires par l'éosine, etc.

Mécanisme de la coloration des tissus. — Pour expliquer la coloration des tissus, on a d'abord fait appel à des phénomènes purement physiques ou purement chimiques. La théorie chimique de la coloration admet la formation de véritables combinaisons entre la solution colorante et le tissu. Pour les couleurs d'aniline, il y aurait un dédoublement de la couleur et une combinaison du radical colorant avec certaines parties de la substance du tissu, pour former un nouveau corps insoluble. Les albuminoïdes des tissus, selon leur nature acide ou basique, se combineraient avec des couleurs basiques ou acides et formeraient des sels avec ces couleurs. En réalité, la plupart des albuminoïdes se colorent aussi bien avec les colorants basiques qu'avec les colorants acides. Ils peuvent suivant les circonstances, se comporter comme acide ou comme base. Seules, les substances à affinité élective très énergique seraient de vraies bases ou de vrais acides.

Pour certains auteurs, beaucoup de colorations tissulaires s'expliquent par des phénomènes de dissolution : la couleur se dissout dans la substance même de la cellule et forme ce qu'on a appelé une solution solide. Si la solubilité de la couleur est égale dans le bain et dans la cellule, cette couleur se répartit également entre les deux; si la solubilité est inégale, plus grande dans la cellule, l'intensité de la coloration croîtra en proportion de cette inégalité. Cette théorie a été surtout soutenue par *Otto Witt*. Elle ne s'applique qu'à quelques cas, en particulier à certaines colorations électives des graisses.

On pense plutôt aujourd'hui que beaucoup de colorations histologiques reposent sur des phénomènes d'*adsorption*, c'est-à-dire sur ces phénomènes d'attraction et d'adhérence intime qui s'exercent entre les liquides et la surface des solides.

Beaucoup de solutions colorantes ne sont pas de vraies solutions, mais des suspensions colloïdales. Les corps organiques que l'on colore sont eux-mêmes formés de substances qui se trouvent le plus souvent à l'état colloïdal. Les interactions se passent ainsi entre colloïdes.

Ces phénomènes d'adsorption peuvent subir des complications croissantes : entre la simple cohésion d'une couche liquide ultramince à la surface du solide

et les phénomènes d'adsorption qui se passent lorsque des corps dissociés et des colloïdes sont en présence, il y a de grandes différences. Dans ce dernier cas, il se forme des édifices moléculaires nouveaux, dont la stabilité, bien que soumise à d'autres lois, peut se rapprocher de celle des combinaisons chimiques. Enfin, la formation des laques colorées insolubles par l'emploi des mordants et des fixateurs, le virage des teintes sous l'influence des acides et des bases, les affinités spéciales des couleurs acides (sels de bases incolores) ou basiques (sels de bases colorées) pour telle ou telle partie d'un tissu, etc., tendent à nous faire penser que parfois de véritables combinaisons chimiques peuvent se former (1).

PRATIQUE DES COLORATIONS

Nous décrirons ici les principales colorations usitées pour l'étude du sang et des tissus hémopoiétiques, laissant de côté les méthodes spéciales qui seront décrites à propos de chaque cas particulier.

I. — Coloration des lames de sang desséchées et fixées.

a) *Hématéine-éosine, hématéine-éosine-orange.* — On colore d'abord énergiquement avec une solution aqueuse d'éosine à 1 p. 200, ou mieux, avec :

Éosine à l'eau	1 gramme
Orange	1 gramme
Eau	200 grammes

On lave à l'eau. On colore ensuite progressivement en surveillant au microscope jusqu'à coloration suffisante des noyaux par la solution alunée d'hématéine (2). On lave à l'eau de source, puis on passe par les alcools, le xylol et on monte au baume. Noyaux bleus, hématies rose-orangé, granulations éosinophiles rouge vif.

b) *Thionine, toluidine.* — On emploie ces substances en solution aqueuse. Les solutions de toluidine (à 1 p. 200) ont à peu près les mêmes effets que les solutions de thionine, mais elles sont beaucoup plus énergiques et donnent une métachromasie plus accentuée. On colore à fond, on lave à l'eau et on monte au baume, à la résine dammare ou à l'huile de cèdre.

Ces préparations ont une tendance à se décolorer lorsqu'on passe dans les alcools. On peut employer un procédé, qui ne convient qu'aux préparations de sang desséché et ne doit jamais être employé avec les préparations de sang fixé frais, avec les empreintes et les coupes. Après avoir lavé à l'eau, on laisse sécher et on monte dans l'huile de cèdre épaisse. On peut aussi garder la préparation sans

(1) On pense aujourd'hui que la plupart des phénomènes chimiques qui se passent dans les colorations sont surtout des phénomènes d'*oxydation* et de *réduction*, que favorisent les mordants. Sur toutes ces questions, consulter, Fauré-Frémiet, Mayer et Schaeffer, *Archives d'An. micr.*, XII, 1910. Giemsa in Prowazek, Handbuch der pathogenen Protozoen, I, 1912. Michaelis, Färbungen in *Encyclopédie d'Ehrlich*, 1910. Heidenhain, Färbungen in *Encyclopédie d'Ehrlich*, 1910. Unna, *Archiv f. mikr. Anatomie*, LXXXVII, 1916. Michaelis, *Archiv. f. mikr. An.* XCIV, 1920.

(2) Il ne faut pas décolorer l'hématéine à l'alcool chlorhydrique lorsqu'on se sert de lames de sang fixées après dessiccation.

la recouvrir d'une lamelle. On examine dans l'huile de cèdre avec un objectif à immersion. Noyaux en bleu-violet, hématies en vert, granulations acidophiles des leucocytes vert bleuâtre. Le bleu de Unna peut être employé seul, comme les solutions de toluidine.

c) *Éosine-orange toluidine.* — On colore énergiquement avec la solution d'éosine-orange indiquée plus haut. On lave à l'eau. On colore avec la solution de toluidine. Lavage à l'eau. Décolorer avec précaution à l'alcool à 70°. Monter rapidement. Cette méthode réussit mieux sur les lames où le sang a été fixé frais. On utilisera avec avantage la modification de *Cochinal* (1) : dessiccation, fixation par l'acide chromique à 1 p. 100, lavage à l'eau ; colorer à fond avec l'éosine ou l'éosine-orange ; eau ; alcool à 70° ; eau ; bleu de toluidine, eau, bleu azur II en solution aqueuse à 1 p. 1.000, tannin à 5 p. 100, alcool à 70°, dessiccation. Cette coloration trouve son emploi aussi sur le sang fixé frais et sur les empreintes et et les coupes de tissus hémopoiétiques. Hématies en rose-orangé, noyaux en bleu, granulations acidophiles en rouge.

d) *Orange-fuchsine acide-vert de méthyle.* — *Ehrlich* a employé simultanément l'orange, le vert de méthyle et la fuchsine acide avec lequel on obtient en vert la coloration des noyaux, en orange celle des hématies et en rouge celle des granulations éosinophiles (2). *Morel et Dalous* ont donné une excellente formule de ce mélange (3) :

On prépare les trois solutions suivantes :

1) Orange	0 gr. 10
Eau formolée à 4 p. 100.	100 cc.
2) Vert de méthyle.	0 gr. 20
Solution d'acide acétique à 1 p. 100.	13 cc.
Eau formolée à 4 p. 100	100 cc.
3) Rubine acide	0 gr. 10
Eau formolée à 4 p. 100.	100 cc.

Au moment de colorer, on mélange les trois solutions à volume égal en ajoutant d'abord le vert de méthyle à l'orange, puis la rubine en dernier lieu, pour éviter les précipités. Colorer 10 minutes, laver à l'eau et sécher. Noyaux en vert pâle, hématies orange, granulations éosinophiles rouge vif, granulations des polynucléaires de l'homme violacées.

e) *Éosine-bleu de méthylène. Méthodes de coloration dans lesquelles interviennent le bleu de méthylène et ses dérivés.* — Ces méthodes ont acquis, dans ces dernières années, une grande importance, surtout à cause des applications qu'elles ont trouvées dans l'étude des parasites du sang. Aussi nous nous y arrêterons un instant.

Depuis longtemps, on avait remarqué les excellents effets produits par l'emploi

(1) Jolly, *Soc. de Biologie*, 10 novembre 1906.

(2) Ce mélange colorant est connu sous le nom de triacide. Il contient deux couleurs acides (orange et fuchsine acide) et une couleur basique (vert de méthyle). Dans ce mélange, les *trois* groupes basiques du vert de méthyle (Triphénylméthyle) sont considérés comme complètement saturés par les deux couleurs acides, d'où le nom de triacide. Ce mélange est célèbre parce qu'il colore électivement en violet les fines granulations des leucocytes polynucléaires du sang de l'homme (voir chap. v) ; il a été donné comme un exemple de couleur neutre ; on le trouve tout préparé dans le commerce

(3) Morel et Dalous, *Presse médicale*, 12 août 1903.

combiné sur les lames de sang des solutions d'éosine et des solutions de bleu de méthylène. Le bleu de méthylène, comme colorant nucléaire, donnait des colorations de contraste beaucoup plus pures que les solutions d'hématoxyline ou d'hématéine, et mieux qu'elles, permettait de mettre en évidence les granulations leucocytaires. L'emploi de la toluidine (qui est un bleu de méthylène) recommandée par *Dominici*, ajoutait à ces avantages celui d'obtenir des teintes métachromatiques.

Mais les résultats étaient très inconstants, d'où l'indication d'un très grand nombre de méthodes, dans lesquelles intervenaient des substances considérées comme mordants ou fixateurs du colorant. C'est alors que *Romanowsky* découvrit que les mélanges de solutions d'éosine et de solutions de bleu de méthylène en certaines proportions avaient la propriété de colorer le noyau de l'hématozoaire de *Laveran*. En raison de l'extension considérable prise par les recherches de parasitologie sanguine, cette méthode de coloration acquérait ainsi beaucoup d'importance. De toutes parts, on se mit à chercher les conditions de ces nouvelles propriétés. Elles furent attribuées par *Nocht* à la formation d'un nouveau corps, le rouge du bleu de méthylène, qui, comme les recherches ultérieures l'ont montré, parait être un mélange d'*azur de méthylène* et de *violet de méthylène*. En présence d'un alcali en effet (potasse, soude, carbonate de soude, carbonate de lithine, etc.) il apparaît, dans les solutions du bleu de méthylène, de nouvelles substances colorantes ; ces corps se forment spontanément en petite quantité, dans les vieilles solutions de bleu, même sans l'addition de potasse ou de soude, sous l'influence probable de traces d'alcali provenant du verre.

Ces dérivés, doués de propriétés nouvelles, existent dans le *bleu de Unna* qui est une solution de bleu de méthylène préparé avec du carbonate de potasse. C'est eux, probablement, qui donnent à cette solution ses propriétés métachromatiques. C'est aussi l'azur de méthylène qui agit dans le bleu Borrel à l'oxyde d'argent recommandé par *Laveran* pour la coloration des hématozoaires (1). L'azur de méthylène qui a la propriété de colorer en rouge violacé le noyau des protozoaires, a été isolé et se trouve dans le commerce sous forme de chlorhydrate (2).

Le violet de méthylène coexiste à côté de l'azur dans les vieilles solutions de bleu de méthylène. C'est surtout lui qui, dans le bleu de Unna, donne la métachromasie. Peut-être joue-t-il un rôle dans la coloration spéciale du noyau des protozoaires.

En même temps qu'on découvrait les propriétés remarquables des dérivés du bleu de méthylène, on avait remarqué que les mélanges d'une solution d'éosine

(1) Laveran, *Soc. de Biologie*, 15 avril 1899. Une solution de nitrate d'argent est traitée par une solution de soude. L'oxyde d'argent qui se précipite est lavé avec soin. Dans le flacon qui contient l'oxyde d'argent, on verse alors une solution concentrée de bleu de méthylène, on agite, on laisse en contact pendant quelques jours, puis on décante. Le sang desséché sur lame est coloré par le mélange :

Bleu Borrel	1	centimètre cube.
Sol. aq. d'éosine à 1 p. 1.000 . .	5	— —
Eau distillée	4	— —

Après douze à vingt-quatre heures, laver à l'eau distillée, plonger deux minutes dans une solution de tannin à 5 p. 100 ; laver, sécher, monter au borax ou à l'huile de cèdre.

(2) L'azur I est le chlorhydrate d'azur de méthylène pur. L'azur II, presque toujours employé, est un mélange de chlorhydrate d'azur et de chlorhydrate de bleu de méthylène.

et d'une solution de bleu de méthylène donnaient lieu à la formation d'un précipité doué de propriétés colorantes toutes particulières. Ce précipité est formé par un nouveau corps dû à la saturation de l'éosine (couleur acide) par le bleu (couleur basique) ; c'est une couleur neutre, dans le sens d'*Ehrlich*. Ces éosinates se forment aussi avec l'azur et avec le violet de méthylène. Mais, tandis que les éosinates d'azur et de violet de méthylène ont la propriété de colorer en rouge violacé le noyau des protozoaires, les éosinates de bleu de méthylène ne la possèdent pas. On réserve le nom de méthode de Romanowsky aux procédés de coloration qui font appel à la propriété remarquable des éosinates d'azur et de violet de méthylène. Ces éosinates sont insolubles dans l'eau ; le plus souvent, on les dissout dans l'alcool méthylique. L'expérience a montré que le colorant neutre n'exerçait son action que si, au moment de s'en servir, on diluait la solution alcoolique avec l'eau distillée jusqu'à l'apparition d'un précipité.

Les méthodes qui font intervenir les éosinates de bleu de méthylène et d'azur et les dérivés du bleu de méthylène ont été utilisées dans des buts très différents. Dans la plupart des cas, ces méthodes ont été employées pour colorer les hématozoaires, sur lame de sang desséché, à cause des propriétés électives toutes spéciales des éosinates d'azur et de violet de méthylène. C'est à l'ensemble de ces procédés qu'est réservé le nom de méthode de coloration de *Romanowsky*, pour laquelle les solutions de *Leishman* et de *Giemsa* sont les plus usitées.

Dans d'autres cas, les éosinates ont été employés dans un but purement histologique. Les éosinates de bleu (non transformé) ont été utilisés pour mettre en évidence les granulations acidophiles (coloration de May-Grünwald, dans laquelle n'interviennent pas les dérivés du bleu). Ou bien, on a employé l'azur et le violet de méthylène, à cause de leurs propriétés métachromatiques ; c'est ce que l'on fait avec le bleu de Unna, qui est obtenu par l'action du carbonate de potasse à chaud sur le bleu de méthylène et contient les dérivés du bleu et qui possède des propriétés métachromatiques très énergiques, ressemblant à celles de la toluidine, mais plus énergiques encore.

Enfin, on a cherché à associer, dans une même opération, la coloration par l'éosinate de bleu de méthylène (May-Grünwad) destinée à mettre en évidence les granulations acidophiles des leucocytes, à la coloration de Romanowsky (*Giemsa*) pour obtenir en même temps la métachromasie et la coloration des protozoaires. C'est ce qu'on réalise dans la méthode de *Pappenheim*.

Après avoir donné ces explications théoriques indispensables, nous allons indiquer les principaux de ces procédés.

Colorations de Giemsa (1). — La solution de Giemsa contient l'éosinate d'azur de méthylène dans un mélange d'alcool méthylique et de glycérine (2). On fixe la

(1) Giemsa, *Centralblatt f. Bakteriologie*, 1904, 1914. *Deutsche med. Woch.*, 1907, 1909 et 1910. — Pröscher, *Centralblatt f. allg. Path.*, XVI, 1905. — Scott, Thompson and Hydrick, *Folia hœmatologica*, XII, 1911.

(2) La solution de Giemsa se trouve dans le commerce. Pour la préparation de l'éosinate d'azur et de colorants du genre de ceux de Giemsa, voir Tribondeau, *Annales Pasteur*, XXXI, 1917 et *Soc. de Biologie*, 8 juin et 22 juin 1918. La préparation des mélanges de ce genre consiste essentiellement à porter à l'ébullition une solution aqueuse alcaline contenant le bleu de méthylène et l'éosine. On obtient en même temps les dérivés du bleu de méthylène et les éosinates. Le précipité, qui contient l'éosinate d'azur, l'éosinate de violet de méthylène et un excès de bleu de méthylène et de violet de méthylène, est recueilli, séché et dissous dans l'alcool méthylique pur.

lame de sang desséché avec de l'alcool méthylique. On prépare en même temps dans une large éprouvette la solution extemporanée et la solution de Giemsa :

Colorant de Giemsa	0 cc. 5
Eau distillée bien neutre	10 cc.

On fait tomber goutte à goutte le colorant dans l'eau distillée. La lame est plongée dans la dilution ; on colore 10 à 15 minutes, on lave à l'eau ; sécher ; examiner dans l'huile de cèdre avec un objectif à immersion. On peut, pour l'examen avec les objectifs à sec déposer une goutte d'huile de cèdre et appliquer une lamelle.

La fixation du sang desséché peut être réalisée avec la solution colorante elle-même non diluée. On dépose la lame à plat sur un godet, ou sur le fond d'une boîte de Petri, on recouvre avec 20 gouttes de la solution colorante ; pour empêcher l'évaporation de l'alcool, on recouvre le tout du couvercle d'une boîte de Petri. Après une à deux minutes, on ajoute directement 20 cc. d'eau distillée, de façon que la lame soit bien recouverte par le colorant ainsi dilué. On surveille et on attend le temps nécessaire à la coloration, environ une demi-heure. Les globules rouges doivent être roses et les noyaux violets. Cette manière de faire convient aussi aux solutions de *Tribondeau* imitées de celles de *Giemsa*. On lave, on sèche au buvard et on examine dans l'huile de cèdre.

La fixation préalable de la lame peut être réalisée aussi par le colorant de Leishman ou par le colorant de May-Grünwald qui contiennent de l'alcool méthylique.

L'eau distillée employée pour la solution du colorant de Giemsa, doit être neutre. On se sert, comme indicateur, du rouge neutre. A un échantillon d'eau distillée, on ajoute une ou deux gouttes d'une solution de rouge neutre à 1 p. 100. La coloration qu'on obtient généralement est rose, indiquant une légère acidité. On ajoute alors peu à peu une solution à 1 p. 100 de carbonate de soude jusqu'à ce qu'on obtienne un virage au jaune-orangé persistant (1).

Le mode d'emploi des solutions de Giemsa varie du reste un peu suivant que la méthode est destinée à la coloration des Protozoaires parasites du sang on a une coloration histologique. Aussi ne peut-on indiquer de règle absolue. Les temps et les modalités de la technique varient suivant le but de la recherche et suivant l'objet d'étude.

Coloration de Leishman. — La solution de Leishman (2) contient, comme celle de Giemsa, l'éosinate d'azur dissous dans l'alcool méthylique. On recouvre la lame de sang, sèche mais non fixée, avec un nombre de gouttes suffisant (10 gouttes).

(1) On peut se servir comme indicateur d'une solution d'hématoxyline ; on sature goutte à goutte par une solution de carbonate de potassium à 1 p. 100 jusqu'à ce que l'eau colorée en jaune par l'hématoxyline prenne une coloration violacée persistante. L'emploi d'une eau distillée absolument neutre ou légèrement alcalinisée est une condition nécessaire de la coloration des protozoaires. Dans les recherches hématologiques, l'eau distillée légèrement alcalinisée ne donne pas toujours de bons résultats lorsqu'on veut avoir les hématies bien colorées au rose par l'éosine. L'eau employée devra être à la limite acide de la neutralité au rouge de phénol ; de bons résultats seront obtenus par une neutralisation exacte en présence de dibromocrésolsulfonphtaléine (Aguilhon et de Leobardy, *Soc. de Biologie*, 22 janvier 1921).

(2) Le colorant de Leishman est livré dans le commerce soit sous forme de solution, soit sous forme de poudre. Dans ce dernier cas, on dissout la poudre dans l'alcool méthylique pur et neutre à raison de 0,2 grammes pour 10 cc. Voir Leishmann. *J. Roy. mic. Soc. London*, 1901, et *Bristish med. Journal*, 1901.

On recouvre pour éviter l'évaporation de l'alcool. Après une minute on ajoute 20 gouttes d'eau distillée neutralisée. Colorer environ 10 minutes. On lave à l'eau et on sèche comme pour le Giemsa.

Coloration de May-Grünwald (1). — La solution de May-Grünwald contient dans l'alcool méthylique, l'éosinate de bleu de méthylène non transformé en azur. Elle n'a donc pas les propriétés spéciales de l'azur. Comme dans la coloration de Leishman, on recouvre le frottis non fixé par 10 gouttes. Après deux ou trois minutes, on ajoute 20 à 40 gouttes d'eau distillée neutralisée. Après avoir bien mélangé, on laisse agir 2 minutes, puis on lave à l'eau distillée. Cette coloration est souvent employée comme *premier temps* dans la coloration de Giemsa et dans la coloration de Pappenheim.

Coloration de Pappenheim. (2). — Pappenheim a eu l'idée d'associer les effets de l'éosinate de bleu de méthylène et d'éosinate d'azur en faisant agir d'abord le mélange de May-Grünwald, qui colore les granulations acidophiles des leucocytes, puis le mélange de Giemsa, qui colore les corps azurophiles (granulations azurophiles des leucocytes mononucléaires et noyau des protistes parasites du sang). Pour obtenir, en outre, des teintes métachromatiques, l'auteur a ajouté l'action de la toluidine. C'est le mélange panchrome de Pappenheim, qu'on emploie exactement comme la solution de Giemsa. Ce mélange contient l'azur, le violet de méthylène et la toluidine. Le premier temps consiste à faire agir d'abord la solution de May-Grünwald comme précédemment (solution pure 1 à 2 minutes) — puis ajouter l'eau distillée dans la proportion de 1 goutte d'eau distillée pour 1 goutte de solution colorante. On laisse agir 2 à 3 minutes au plus. On porte ensuite la lame face au bas, dans une boite de Laveran contenant une solution diluée de Giemsa (1 cc. d'eau distillée par goutte de Giemsa), que l'on vient de préparer. On attend le temps nécessaire (15 m. à 1 heure) en surveillant au microscope. On lave et on dessèche par agitation à l'air, sans chauffer. Ou bien, on se sert, au lieu du Giemsa, du mélange panchrome de Pappenheim qu'on emploie exactement comme le Giemsa. On peut se servir aussi, comme deuxième temps, du *mélange panchrome de Laveran* (3) qu'on emploie comme le Giemsa, en dilution extemporanée (20 gouttes dans 10 cc. d'eau distillée neutralisée). Ce mélange de Laveran peut aussi être employé seul. On verse 1/2 cc sur la lame desséchée ou fixée, on recouvre; on laisse agir trois minutes. On ajoute 10 cc. d'eau distillée au mélange et on ne laisse la coloration se faire que 15 minutes. Ces méthodes colorent les noyaux des leucocytes en rougeâtre, les corps azurophiles en rouge, les hématies en rose, les granulations acidophiles des leucocytes en rougeâtre, les granulations des cellules d'Ehrlich en violet.

Emploi des solutions aqueuses d'azur. — Pour les recherches histologiques, il y aura souvent intérêt à employer séparément des solutions d'éosine et des solutions

(1) May u. Grünwald, *Centralblatt f. innere Medicin*, 1902. On trouve ce colorant dans le commerce, soit sous forme de solution dans l'alcool méthylique soit sous forme de poudre qu'on dissout dans l'alcool méthylique à raison de 0 gr. 2 pour 10 cc.

(2) Pappenheim, *Technik und Methodologie der klinischen Blutuntersuchung*. 2e ed. 1919. Cette coloration ne doit pas être confondue avec le mélange pyronine-vert de méthyle proposé par le même auteur pour la coloration des cellules plasmatiques.

(3) Ce mélange contient du bleu de méthylène, de l'éosine, de l'azur du violet de méthylène et du bleu de toluidine. Il est livré en solution dans le commerce. Carageorgiadès, *Soc. de Biologie*, 26 octobre 1918. — Jonesco Mihaiesti, *Soc. de Biologie*, 23 novembre 1918. Cretin, *Ass. des anatomistes*, Paris, 1921.

d'azur. On se servira d'une solution d'azur II dans l'eau distillée, à 1 p. 1.000. Mais l'azur seul n'a pas de propriétés métachromatiques. Il colore les corps basophiles en bleu et ne colore pas le noyau des protistes. Un bon procédé est de faire agir d'abord l'éosine-orange, puis la solution aqueuse d'azur, puis une solution aqueuse de toluidine. Ce procédé met bien en évidence, colorées en rouge, les granulations des leucocytes polynucléaires.

Bleu polychrome de Unna (1). — Ce colorant est obtenu en portant à l'ébullition une solution aqueuse de bleu de méthylène, contenant du carbonate de potasse. A côté du bleu de méthylène non transformé, il renferme les dérivés du bleu (azur et violet de méthylène) auxquels il doit ses propriétés métachromatiques énergiques. Il colore en rouge-violet les granulations des cellules d'Ehrlich, la mucine, la substance fondamentale du cartilage. Il est capable de colorer le noyau des protistes parasites du sang. On l'emploi en coloration régressive. On colore énergiquement et on décolore, soit avec l'éther glycérique de Unna très étendu d'eau, soit avec l'eau ; alcool rapidement, xylol, huile de cèdre. L'emploi du bleu de Unna convient mieux aux coupes, aux membranes et au sang fixé frais, qu'à la coloration des lames de sang desséché. Dans ces différents cas, c'est après la fixation à l'alcool fort ou au sublimé qu'il donne les meilleurs résultats.

II. — Coloration des lames de sang fixées sans dessiccation.

Pour les recherches histologiques, la coloration des lames de sang fixées à l'état humide, sans dessiccation, donne des résultats infiniment supérieurs à ceux qu'on obtient avec le sang desséché. C'est là, à proprement parler, la véritable méthode histologique à laquelle peuvent être appliquées presque toutes les colorations (2). Nous ne pourrons citer que les principales. Les lames sur lesquelles le sang a été fixé frais ne doivent pas en général subir de dessiccation, entre l'action du fixateur et l'action du colorant. On les colore humides sortant de l'eau de lavage. Cependant, après la fixation par les vapeurs osmiques, on laisse sécher pour produire l'adhérence.

Eosine-orange-hématéine. — Colorer à fond par la solution d'éosine-orange, comme précédemment, laver à l'eau, à l'alcool à 70°. Colorer progressivement à l'hémalun. Eau, alcools, xylol, baume. Dans certains cas, il pourra être utile de décolorer l'hématéine par l'alcool chlorhydrique à 1 p. 1.000 (3), et après virage dans l'eau de source, on colorera par l'éosine-orange, en traitant la préparation comme une coupe. Après la fixation par les mélanges chromo-osmiques, il pourra être utile de mordancer une ou deux minutes dans la teinture d'iode étendue. Bien enlever l'iode par l'alcool à 70° avant de colorer. Alcools, xylol, baume.

(1) On le trouve en solution dans le commerce. Voir Unna, *Zeitschrift f. wiss. mikr.*, VIII, 1891. Les différentes formules de bleu alcalin ont des propriétés analogues.

(2) D'une manière générale, la coloration après dessiccation convient surtout à l'étude des réactions colorantes des granulations, la coloration après fixation du sang frais convient à l'étude du noyau et des structures cellulaires.

(3) Ce qui est possible ici après un grand nombre de fixateurs, mais ce qui n'est pas possible sur le sang desséché.

Bleu de toluidine. — Solution aqueuse fraiche à 1 p. 100 ou à 1 p. 200. Colorer à fond. Laver longtemps à l'eau. Décolorer rapidement à l'alcool à 70°. Monter au baume ou à l'huile de cèdre sans dessécher.

Eosine-orange-toluidine. — Colorer comme précédemment. Décolorer rapidement à l'alcool à 70°. Monter au baume ou à l'huile de cèdre sans dessécher. On emploiera surtout cette coloration combinée après la fixation par les mélanges de Dominici. On peut remplacer la toluidine par un autre bleu basique en particulier le bleu de Unna. On peut utiliser pour fixer le bleu une solution aqueuse de tannin à 5 p. 100 qu'on fait agir après la toluidine.

Eosine-azur-toluidine. — Colorer à fond à l'éosine ou mieux à l'éosine orange. Laver à l'eau, alcool à 70°, eau. Colorer avec une solution aqueuse récente à 1 p. 100 de bleu de toluidine. Eau; bleu azur II en solution aqueuse à 1 p. 1.000. Tannin à 5 p. 100 qui décolore et fixe en même temps la couleur. Alcool à 70°. Monter rapidement au baume ou à l'huile de cèdre, sans dessécher.

Colorations de Romanowsky. — Les différentes méthodes qui utilisent les éosinates d'azur et de violet de méthylène que nous avons indiquées plus haut à propos du sang desséché peuvent être employées sur le sang fixé frais surtout par les solutions saturées de sublimé. Dans ce dernier cas, on élimine avec soin le sublimé par de la teinture d'iode étendue, puis l'iode par l'alcool à 70°. On colore avec la solution de Giemsa diluée, comme nous l'avons indiqué plus haut, mais en laissant 12 à 24 heures. Laver à l'eau; déshydrater rapidement à l'acétone. Xylol, baume ou huile de cèdre.

On peut colorer d'abord par la solution de May-Grünwald 10 à 20 minutes, puis par le mélange de Giemsa, ou le panchrome de Pappenheim ou le panchrome de Laveran, en vase fermé, à l'étuve à 37° pendant une heure. On peut différencier dans l'eau très légèrement acétifiée (1 à 5 gouttes dans 100 cc. d'eau). Laver à l'eau, sécher ou déshydrater à l'acétone. Ces colorations peuvent être employées aussi après la fixation du sang frais, humide, par les vapeurs osmiques. C'est là une excellente méthode. Vapeurs osmiques, trente secondes; Giemsa dilué à 1 p. 10, 1 à 2 heures ; laver, sécher ou déshydrater à l'acétone; la coloration se fait en général plus lentement que sur le sang disséché; il est parfois nécessaire de la prolonger 24 heures.

Bleu polychrome. — Cette solution pourra être employée seule ou remplacer la solution de toluidine dans la coloration éosine-orange-toluidine. On l'utilisera après le sublimé et après les mélanges de Dominici.

Hématoxyline au fer. — Cette coloration sera surtout employée après la fixation par les mélanges chromo-osmiques ou par le sublimé.

La préparation, au sortir de l'eau, est plongée dans une solution d'alun de fer à 5 p. 100 dans l'eau distillée où elle séjourne 24 heures; on lave à l'eau distillée et on porte ensuite la lame, soit dans l'hémalun soit dans une solution d'hématoxyline à froid dans l'eau distillée à 1 p. 200, soit dans la solution suivante :

Hématéine	1 gramme.
Alcool absolu	10 cc.
Glycérine	10 cc.
Eau distillée	80 cc.

On colore au moins 24 heures. On lave à l'eau de source. Décolorer sous le microscope avec une solution d'alun de fer à 1 p. 100. Bien laver à l'eau. Alcools, xylol, baume.

Cette importante méthode rend de grands services dans l'étude des structures cellulaires. On l'emploiera avec profit pour l'étude du sang des Vertébrés ovipares. Après les mélanges chromo-osmiques, elle permet de colorer le centrosome des leucocytes ; on pourra, dans ce cas, pousser plusieurs jours le mordançage et la coloration.

L'hématoxyline au fer peut être employée seule ; comme les hématies sont colorées, l'emploi d'un colorant plasmatique sera en général inutile. Dans certains cas, on pourra pousser la décoloration de façon à ne garder colorés que les noyaux et on colorera ensuite avec une solution aqueuse d'éosine, de fuchsine acide ou d'orange.

Safranine. — L'emploi de la safranine comme colorant nucléaire rendra des services dans l'étude du sang des Batraciens et des Sauropsidés ainsi que dans l'étude du sang leucémique. On fixera par un mélange chromo-osmique. On emploiera soit une solution dans l'eau anilinée, soit plus simplement une solution aqueuse concentrée. On colore à fond 12 à 24 heures soit sans mordançage, soit avec mordançage préalable par l'alcool iodé ou par le permanganate de potasse à 1 p. 100. Laver rapidement à l'eau. Décolorer dans une solution hydro-alcoolique de vert lumière ou contenant à la fois du vert lumière et du violet acide (mélange de Benda). On emploiera de la même manière, comme colorant plasmatique, les solutions de bleus acides (bleu d'aniline, bleu de méthyle, bleu pour micrographie de Saint-Denis, etc.). Les granulations acidophiles des leucocytes seront teintes en vert ou en bleu suivant le colorant de fond employé.

Magenta. — Le magenta est une fuchsine basique qu'on emploie en solution aqueuse saturée. On l'utilisera après fixation par les mélanges chromo-osmiques. Elle donne de belles colorations nucléaires d'un rouge plus vif que la safranine. On décolore et on colore en même temps le cytoplasme avec une solution hydro-alcoolique de vert lumière ou avec le mélange de Benda (vert lumière et violet acide).

Safranine-violet de gentiane-orange. — Cette méthode, due à Flemming, s'emploiera uniquement après la fixation par les mélanges chromo-osmiques. On colore à fond par la safranine. On décolore à l'eau et à l'alcool à 70°. On colore par une solution aqueuse de violet de gentiane (1). On différencie par une solution aqueuse d'orange qui extrait l'excès de violet et agit comme colorant plasmatique. Cette méthode est délicate et d'un emploi limité ; mais elle est utile dans les recherches cytologiques.

Safranine. Hématéine (2). — On emploiera cette méthode après la fixation du sang frais par les mélanges chromo-osmiques. Colorer à l'hématéine, différencier dans l'alcool chlorhydrique. Neutraliser à l'eau de source. Colorer à la safranine. Eau, alcool, xylol, résine dammar. Cette coloration rendra de grands services dans l'étude des transformations de la chromatine nucléaire au cours de l'hématopoièse. Elle s'applique à l'étude du sang embryonnaire, et surtout à la coloration des tissus hémopoiétiques sur coupes ou sur empreintes.

(1) On peut employer la méthode de Gram, c'est-à-dire mordancer par une solution iodo-iodurée.

(2) Regaud, *Archives An. micr.* IV, 1901. — Jolly, *Archives d'An. microsc.*, XI, 1907.

III. — Coloration du sang dans les membranes.

La plupart des méthodes précédentes peuvent être appliquées à la coloration des membranes. Nous recommanderons surtout les suivantes.

a) Fixer avec le mélange bichromate-sublimé-formol (5 à 10 p. 100 de formol), 15 à 30 minutes suivant l'épaisseur de la membrane. Passer à la teinture d'iode étendue pour enlever le sublimé, puis à l'alcool à 70° pour enlever l'iode. Colorer à l'hémalun. Différencier légèrement par l'alcool chlorhydrique ; arrêter la décoloration dans l'eau de source. Colorer avec une solution d'éosine-orange à 1 p. 1000. Alcool, xylol, résine dammare.

b) Même procédé de fixation ou employer un des liquides de Dominici. Colorer à fond avec une solution d'éosine-orange à 1 p. 100. Laver à l'eau. Décolorer légèrement à l'alcool. Eau. Solution de toluidine à 1/200. Laver à l'eau. Différencier avec précaution par l'alcool à 70°. Alcool, xylol, baume ou huile de cèdre. On peut utiliser, pour différencier, de l'alcool à 70° contenant un peu d'éosine.

La toluidine peut être remplacée par un bleu basique, par le bleu polychrome, le bleu Borrel ou une solution de violet 5 B. à 1 p. 100. On peut mordancer pendant quelques secondes par une solution de tannin ou ajouter le tannin à la solution d'éosine-orange (1).

Beaucoup d'autres colorations des membranes pourront être employées après fixation par les mélanges bichromate-sublimé-formol ou les mélanges au sublimé iodé, en particulier l'hématoxyline au fer avec les différentes colorations plasmatiques (Van Gieson, picro-ponceau, éosine, vert lumière, etc.). *Rubens-Duval* a recommandé la méthode suivante : colorer à l'hématéine ; décolorer à l'alcool chlorhydrique ; mordancer légèrement à l'alun de fer ; colorer à l'éosine plusieurs heures ; enlever l'excès à l'alcool à 90° ; colorer avec une solution de vert lumière à 1 p. 100 ; enlever l'excès de vert par une solution de tannin-orange.

Pour l'étude des cellules d'Ehrlich, on pourra employer les colorations au bleu de toluidine ou au bleu polychrome que l'on fera agir après fixation par l'alcool à 95° ou le sublimé saturé.

IV. — Coloration des empreintes, fixées humides.

Les méthodes de coloration que nous venons d'indiquer pour le sang fixé sans dessiccation et pour les membranes, sont naturellement applicables à la coloration des empreintes des tissus hématopoiétiques, à condition que celles-ci aient été fixées encore humides et n'aient subi aucune dessiccation. Après la fixation par les vapeurs osmiques et par les mélanges bichromate-sublimé-formol, on emploiera surtout la coloration hématéine-éosine-orange. Après fixation par les mélanges au sublimé iodé, on colorera à l'éosine-orange-toluidine. Après fixation par les mélanges chromo-osmiques, on emploiera les méthodes à la safranine, l'héma-

(1) Rubens Duval in Gilbert et Weinberg. Le tannin est ajouté à la solution d'éosine-orange dans la proportion de 1 p. 100. Si le tannin a trop fixé le bleu, employer comme décolorant l'alcool à 90° légèrement acétifié.

toxyline au fer et aussi l'hématéine-éosine-orange, en mordançant d'abord à la teinture d'iode faible et en enlevant soigneusement l'iode. Après la fixation par le sublimé, la plupart des colorations pourront être utilisées.

V. — Coloration des coupes de tissus et d'organes hématopoiétiques.

Toutes les colorations histologiques sont naturellement applicables ici. Elles varieront suivant le but de la recherche, suivant qu'on veut étudier les cellules sanguines, le tissu conjonctif, le tissu élastique, etc. Nous ne pouvons songer à les décrire toutes. Un certain nombre seront données dans les chapitres consacrés aux tissus hématopoiétiques. On n'indiquera ici que celles qui concernent particulièrement les cellules sanguines.

a) Après fixation par les mélanges bichromate-sublimé-formol.

Employer surtout la coloration combinée hématéine-éosine-orange. Colorer d'abord à l'hématéine, décolorer par l'alcool chlorhydrique. Neutraliser dans l'eau de source ou dans l'eau légèrement lithinée. Colorer ensuite avec la solution éosine-orange à 1 p. 1.000 (1).

Coloration éosine-orange-toluidine, en colorant d'abord à l'éosine-orange, comme pour les membranes. Cette coloration donne encore de meilleurs résultats après la fixation par les liquides de Dominici, dans lesquels l'iode agit comme mordant.

Éosine-bleu azur. Colorer d'abord à fond avec une solution aqueuse à 1 p. 1.000 d'éosine, puis colorer 12 à 24 heures avec une solution aqueuse de bleu azur II à 1 p. 1.000. Différencier dans l'alcool ou dans un mélange d'acétone et d'alcool absolu (2).

Les solutions de Giemsa peuvent aussi être employées. On fait agir 24 heures une solution diluée. Après lavage à l'eau distillée, on déshydrate par l'acétone, on éclaircit par le xylol et on monte dans le baume ou l'huile de cèdre (3).

b) Après fixation par les mélanges au sublimé-iodé, on emploiera surtout la coloration à l'éosine-orange-toluidine avec ses variantes. On colore à fond à l'éosine-orange à 1 p. 100. On peut mordancer d'abord avec une solution de tannin à 1 p. 100, pendant 10 secondes, ou avec une solution d'éosine-orange à laquelle on ajoute du tannin (à l'alcool ou à l'éther) dans la proportion de 1 p. 100 (4). Après quelques secondes, on lave à l'eau pour enlever l'excès de tannin et on colore par la solution éosine-orange sans tannin. Lorsqu'on juge la coloration suffisante, on lave à l'eau, rapidement afin de ne pas faire disparaître

(1) Pour la recherche des leucocytes éosinophiles dans les tissus, Favre (*Soc. de Biologie*, 6 janvier 1917) recommande, après fixation par le mélange de Zenker, et la coloration à l'hématéine et à l'éosine, de différencier la coupe dix minutes dans l'eau contenant 2 grammes de bicarbonate de soude p. 100 centimètres cubes.

(2) Maximoff (*Zeitschrift f. wiss. Mikroskopie*, XXVI, 1909), fait agir pendant 12 à 24 heures un mélange des deux solutions (10 centimètres cubes de la solution d'éosine à 1. p. 1.000 + 50 à 100 centimètres cubes d'eau distillée + 10 centimètres cubes de solution d'azur à 1 p. 1.000).

(3) Voir Le Sourd et Pagniez, *Soc. de Biologie*, 21 octobre 1911. Pappenheim, *Folia hæmatologica*, XI, 1911. Downey, *Folia hæmatologica*, XV, 1913. Langeron, Précis de microscopie.

La solution varie suivant les cas ; on emploiera le plus souvent une goutte de la solution de Giemsa pour 1 centimètre cube d'eau distillée.

(4) Rubens Duval, in Gilbert et Weinberg, Traité du sang.

l'orange, puis à l'alcool à 70° et à 90°. On colore dans la solution de toluidine à 1 p. 100. L'excès de toluidine est enlevé par l'alcool à 70° et à 90°. Si, par suite du mordançage exercé par le tannin, on a de la peine à enlever le bleu, on peut différencier rapidement dans l'alcool à 90° auquel on ajoute 1 p. 100 d'acide acétique ; alcool absolu ; baume ou mieux huile de cèdre. Les solutions de bleu de méthylène, le bleu Borrel, le bleu polychrome, les solutions de violet de méthyle pourront remplacer la toluidine dans cette coloration. Les résultats varient naturellement suivant les tissus et les temps de fixation ; il ne faut donc pas attendre d'eux une constance absolue ; de plus ces préparations se décolorent souvent assez vite. Malgré ces inconvénients, ces méthodes sont encore aujourd'hui les meilleures pour la coloration des cellules sanguines dans les tissus.

c) Après fixation par les mélanges chromo-osmiques employer les différentes combinaisons où la safranine joue le rôle de colorant nucléaire et dans lesquelles le vert lumière, le violet acide, les bleus acides (bleus de méthyle) sont utilisés comme colorants plasmatiques.

d) Après fixation par les solutions de sublimé saturé, on pourra employer la solution de toluidine seule, le bleu de Unna seul et encore le Giemsa, comme nous l'avons indiqué plus haut (1).

e) Après fixation par l'alcool absolu, qui conserve assez bien les granulations des leucocytes et les mastzelles, on emploiera les bleus basiques (toluidine, bleu polychrome, etc.) et aussi les mélanges vert de méthyle-pyronine phéniqué recommandés par *Pappenheim* pour la coloration des plasmocytes. On colore en chauffant légèrement jusqu'à production de vapeurs et sans dépasser 50°. On lave rapidement à l'eau distillée et à l'alcool à 80°. Sécher au buvard. Alcool absolu, xylol, baume. Noyaux verts, corps des plasmocytes rouges. Cette coloration fugace convient surtout à la recherche des cellules plasmatiques dans les coupes de peau (2).

Enfin, parmi les excellentes colorations combinées, d'un emploi général, qu'on pourra utiliser dans l'étude des tissus hématopoiétiques, pour distinguer le tissu conjonctif des cellules lymphoïdes, nous citerons surtout : hémalun — picro-fuchsine (*Van Gieson*) ; hématéine-picro-ponceau (*Dubreuil*), safranine-picro-bleu (*Dubreuil*), safranine-violet acide (*Benda*), hématoxyline au fer-érythrosine-vert lumière (*Prenant*), hématéine-safran (ou polychroïte) (*Masson*), carmin-bleu d'aniline (*Lacassagne*), les méthodes de *Curtis* au noir-naphtol, les différentes méthodes de *Mallory* et la coloration trichome de *Masson* (hématoxyline au fer — rubine acide-bleu d'aniline) (3).

Montage des préparations. — Les préparations qui ont été colorées doivent être montées dans une résine après déshydratation par les alcools et éclair-

(1) Voir aussi Langeron, *loc. cit.* Giemsa, *Deutsche med. Woch.*, 1910. Schuberg, *Deutsche med. Woch.*, 1909. Weidenreich, *loc. cit.*

(2) Voir Pappenheim. *Virchow's Archiv.*, 1899 et 1901 ; Weidenreich, *loc. cit.* ; Grosso, *Folia hæmatologica*, IX, 1910. La solution est ainsi composée : vert de méthyle, 0,15 ; pyronine, 0,25 ; alcool à 90°, 2 cc. 5 ; glycérine 20 cc ; eau phéniquée à 0,5 p. 100, 100 cc.

(3) Je renvoie, pour la pratique de ces différentes colorations aux traités de technique histologique (Bolles Lee et Henneguy, Bolles Lee et P. Mayer, de Rouville, Langeron, Herxheimer et *Encyclopédie technique d'Ehrlich*).

cissement par une essence (1). On emploie généralement le xylol et la résine dammare au xylol ou le baume du Canada dissous dans le xylol. Il faut autant que possible employer du baume bien neutre. La réaction acide des résines et aussi leur action réductrice décolorent les préparations. L'huile de cèdre, peu réductrice, sera employée avec avantage pour les préparations colorées avec les couleurs d'aniline, surtout par les bleus basiques. Pour remédier à l'action décolorante des alcools sur certaines couleurs d'aniline, on remplacera l'alcool absolu par l'acétone ou bien on utilisera des mélanges d'alcool absolu et d'acétone.

Imprégnations métalliques. — Les imprégnations métalliques ne sont utilisées que d'une manière exceptionnnelle dans l'étude des tissus hématopoiétiques. La méthode de l'or sera appliquée à l'imprégnation des nerfs, des cellules migratrices intraépithéliales et des cellules conjonctives des membranes, comme la cornée. La réduction de l'argent permettra d'indiquer les cellules endothéliales de revêtement. Les méthodes de Golgi et de Bielchowsky, en dehors de leur application à l'observation des nerfs des organes hématopoiétiques, rendront surtout des services pour mettre en évidence le tissu de charpente, particulièrement dans la rate et les ganglions.

Artéfacts. — On entend par *artifices de préparàtion* ou *artéfacts* les modifications causées par les réactifs eux-mêmes (fixateurs et colorants) sur les cellules et les tissus. Il est important de les connaître, pour ne pas les confondre avec des structures préexistantes. Nous les signalerons au fur et à mesure que nous les rencontrerons. Nous les verrons surtout à propos des hématies parce que l'hémoglobine est dissoute, précipitée ou modifiée par un grand nombre des réactifs employés en histologie. Mais l'altération produite par le réactif peut devenir une *méthode d'analyse.* Ce qu'il faut seulement, c'est que l'histologiste connaisse les altérations qu'il produit et ne les prenne pas pour des structures véritables. C'est ce qu'il distinguera par l'étude comparative de l'objet vivant et de l'objet traité par les différentes méthodes.

Observation des cellules et des tissus vivants. — L'observation des éléments et des tissus vivants est en effet le meilleur contrôle de l'action des réactifs que nous employons. L'étude des éléments vivants est souvent le point de départ et l'aboutissant de beaucoup de nos observations microscopiques. Cette étude exige une technique

(1) Le montage de la préparation dans une résine est indispensable dans presque tous les cas et en particulier chaque fois qu'il s'agit de coupes, de membranes, d'empreintes et de lames de sang fixées à l'état humide. Exceptionnellement, dans certaines recherches, les lames de sang desséchées et colorées par les méthode à l'éosinate d'azur pourront être conservées sèches sans résine et sans lamelle. On examine au microscope, dans une goutte d'huile de cèdre, avec un objectif à immersion. Après l'examen, on enlève l'huile de cèdre en trempant la lame dans le xylol.

spéciale que nous étudierons à propos de cas particuliers. L'observation des éléments vivants n'est pas toujours possible ; elle exige souvent des objets spéciaux, mais beaucoup des faits que nous aurons l'occasion d'apprendre peuvent être démontrés par l'étude de la cellule vivante : mouvements des leucocytes, phénomènes de migration et de diapédèse, préexistence des globulins dans le sang circulant, disposition des hématies et des leucocytes dans les vaisseaux pendant la circulation, division cellulaire, etc.

Colorations vitales. — On a donné le nom de coloration vitale à des phénomènes assez différents. Ce terme s'applique exactement aux colorations électives de certains tissus, de certains éléments anatomiques obtenus par injection ou absorption de la matière colorante chez un animal vivant. On peut en donner deux exemples précis : la couleur rouge que prennent les os des animaux qui absorbent de la garance avec leurs aliments ; la couleur bleue que prennent à l'air les cylindres-axes des nerfs des animaux auxquels on a fait pendant la vie une injection sous-cutanée d'une solution étendue de bleu de méthylène dans l'eau salée isotonique.

On a donné aussi le nom de coloration vitale aux colorations obtenues sur des tissus séparés du corps. Ce mode de coloration a été appelé quelquefois post-vital, parce qu'il se fait après la mort générale de l'organisme. Il s'agit bien là encore d'une coloration vitale, car les tissus séparés du corps, au moins beaucoup d'entre eux, peuvent survivre encore longtemps.

Mais le nom de coloration vitale a été souvent donné à des colorations obtenues sur des éléments non fixés, mais certainement morts. Il en est ainsi, par exemple, pour la coloration des leucocytes obtenue avec des solutions faibles de bleu de méthylène ou de toluidine à 1 p. 500 sur la goutte de sang simplement étalée et desséchée sur la lame. Cette excellente méthode d'observation extemporanée (1), n'a rien à voir avec une coloration vitale ; c'est seulement une coloration sans fixation. Les éléments sont bien morts ; ils sont même, en partie, fixés par la dessiccation. La coloration des hématies granulo-filamenteuses par des solutions aqueuses de couleurs basiques qu'on fait agir directement sur le sang desséché ou frais, n'est aussi qu'un mode d'examen extemporané et n'est pas une véritable coloration vitale.

Il existe encore un certain nombre de faits qu'on rapporte parfois

(1) Sabrazès, *J. médical français*, IX, 1920.

aux colorations vitales : ce sont ceux qui concernent les organes phagocytaires et excréteurs. Dans certains cas, il s'agit de la coloration d'organes lymphoïdes par des corpuscules colorés insolubles injectés en suspension chez l'animal et transportés par des leucocytes qui les ont phagocytés. Dans d'autres cas, il s'agit de l'excrétion élective par les reins ou d'autres glandes, de substances colorantes injectées en solution. C'est ce qui constitue la méthode des injections dites physiologiques, inaugurée par Chrzoncezwski. Ici la cellule excrétrice emprunte au sang la matière colorante étrangère et l'élimine électivement. Il peut arriver que la substance colorante dissoute se précipite dans la cellule à l'état de grains colorés, phénomène différent de la phagocytose de grains colorés insolubles.

Nous ne retiendrons ici, comme *colorations vitales*, que celles qu'on peut obtenir sur les éléments *vivants* du sang, de la lymphe, des sérosités et du tissu conjonctif et qui s'appliquent aux leucocytes et aux diverses cellules mésodermiques.

Un grand nombre de couleurs ont été employées pour les colorations vitales ; mais le choix est limité, non seulement par les propriétés du colorant, mais par son action toxique propre. Celles qui ont été le plus utilisées sont l'alizarine, la vésuvine, le bleu azur, le bleu de Nil, le bleu crésyl brillant, le bleu de méthylène et le rouge neutre (rouge de toluylène). On peut employer le rouge neutre en solutions très étendues (1 p. 100 à 1 p. 10.000) dans l'eau salée isotonique (1). La solution est injectée sous la peau ou dans les cavités séreuses, les sacs lymphatiques, dans l'animal vivant. On obtient de bons résultats par l'injection sous-cutanée d'une solution très diluée de rouge neutre dans l'eau salée; un petit fragment de la boule d'œdème ainsi produite chez les mammifères est examinée à l'état frais sans réactifs entre lame et lamelle ; on peut aussi injecter dans la cavité du corps et examiner les membranes péritonéales. Pour le sang, la lymphe et les exsudats, on fait l'expérience *in vitro*. On se sert d'une solution aqueuse ou alcoolique dont on dépose une petite goutte sur la lame. On laisse sécher ; on ajoute ensuite une goutte de sang ou d'exsudat, on recouvre d'une lamelle et on lute à la paraffine ; le colorant vital se trouve dilué dans le plasma même (2).

Lorsqu'on fait agir *in vitro* la matière colorante sur le tissu (sang, lymphe, exsudats, etc.), on voit apparaître dans le cytoplasme des granulations colorées. Ce qui se colore d'abord, ce sont le plus souvent des particules étrangères phago-

(1) Les solutions de rouge neutre ont la propriété de changer de teinte sous l'influence des réactifs acides ou alcalins. Des traces d'acide les font virer au rouge et des traces d'alcali les font virer au jaune. Ces différences de teinte s'expliquent par le fait qu'en solution étendue le rouge neutre est toujours plus ou moins dissocié. Les acides forment un sel rouge avec la base ; les alcalis déplacent la base qui est jaune orangé. Cette propriété a été utilisée dans l'étude de la digestion intra-cellulaire. Le bleu de Nil, le bleu crésyl brillant présentent des phénomènes du même genre.

(2) Le bleu crésyl brillant en solution concentrée dans l'alcool à 95° donne de bons résultats. Pour la coloration des granulations graisseuses et lipoïdes, on associe parfois le bleu crésyl au Soudan ; le bleu de Nil peut remplacer le bleu crésyl. Il ne faut pas confondre les précipités formés quelquefois à la surface des éléments par la couleur avec des granulations intra-cellulaires.

cytées, microbes et débris cellulaires. On peut colorer ensuite des produits de réserve et d'excrétion. Plus tard, apparaissent colorées les granulations lipoïdes résultant de l'autolyse. Les granulations leucocytaires et surtout les granulations des cellules d'Ehrlich (mastzelles) se colorent dans ces conditions. Par les couleurs basiques (bleu de méthylène, rouge neutre) on peut colorer aussi les mitochondries (1).

La coloration obtenue ne suspend pas la vie de la cellule, elle n'arrête pas au début les mouvements des leucocytes et des cils vibratiles et n'empêche pas la segmentation de l'œuf. Une question plus difficile à résoudre est celle de la coloration du noyau. Certains auteurs ont prétendu colorer le noyau d'éléments vivants. Peut-être la chose est-elle possible pour certains végétaux, pour les macronucléi de certains protozoaires. Il paraît au contraire que chez les métazoaires, et pour rester dans le domaine des tissus qui nous intéressent, dans le sang, la lymphe et le tissu conjonctif, aucune cellule vivante, aucun leucocyte vivant et mobile ne laisse colorer son noyau. Quand le noyau se colore, c'est que la cellule est morte (2).

Pour expliquer la coloration vitale, on a fait intervenir surtout des causes physico-chimiques : phénomènes d'adsorption à la surface des granules, et, surtout, solubilité plus ou moins grande des substances colorées dans les lipoïdes cellulaires. Des phénomènes de réduction et d'oxydation interviennent dans certaines colorations vitales, la cellule vivante ayant le pouvoir de transformer par réduction la substance colorée en dérivé incolore et de faire réapparaître secondairement la couleur par réoxydation (3).

Il est très difficile de fixer le moment exact où la cellule meurt. Il semble que dans beaucoup de cas, la coloration des granules ne se fait qu'à un moment où la cellule va mourir ; ce sont des colorations « supravitales », « prémortelles ». Les colorations des granulations leucocytaires sur lesquelles est basée la recherche des oxydases (synthèse de l'indophénol, oxydation de la benzidine), paraissent être des colorations supravitales (4).

Les couleurs toxiques (safranine, violet de méthyle) sont impropres à la coloration vitale ; elles altèrent les cellules et le noyau se colore aussitôt. D'autres couleurs basiques ne colorent que des cellules fixées (vert de méthyle, fuchsine).

Pendant longtemps, on n'a employé, en coloration vitale, pour l'étude des cellules sanguines et conjonctives, que les couleurs basiques (bleu de méthylène, rouge neutre). On sait aujourd'hui que des couleurs, d'une constitution chimique différente, appartenant au groupe de la benzidine (bleu trypan, bleu pyrrol ou bleu isamine), employées en coloration vitale, en injections sur l'animal vivant, dans les veines, dans le tissu conjonctif ou dans la cavité péritonéale, ont la pro-

(1) Tschaschin, *Folia hæmatologica*, XIV, 1912.

(2) D'après les observations de Hammar (*Kungl. Svenska Vetenskapsakad. Handlingar*, XLIX, n° 3, 1912) avec l'emploi du bleu crésyl, au début de l'observation du sang, les leucocytes, encore vivants et mobiles, montrent un noyau coloré en vert très pâle. Mais lorsque la cellule meurt, le noyau se colore vivement en violet.

(3) Voir de Beauchamps, *Année biologique*, XI, 1909. Certes, *C. R. Ass. fr. pour l'avancement des sciences*, XXIX, 1900. Fauré-Frémiet, *Archives d'An. micr.* XI, 1909. Henneguy, *Intermédiaire des biologistes*, I, 1898. Plato, *Archiv f. mikr.* An. LVI, 1900. Himmel, *Annales Pasteur*, XVI, 1902. Fischel, *An. Hefte*, XI, 1899, XVI, 1901 et in Encyclopédie d'Erlich. Renaut, *Archives d'An. micr.*, IX, 1907. Haberlandt, *Zeitschrift f. Biologie*, LXIX, 1919. Levaditi et Gabrek, *S. de Biologie*, 25 juillet 1914.

(4) Voir chap. VII.

priété remarquable de colorer le protoplasma granuleux de certaines cellules conjonctives alors qu'elles laissent incolores presque toujours les granulations des leucocytes. Ces substances colorent le protoplasma granuleux des mastzelles du tissu conjonctif, des clasmatocytes, des cellules endothéliales des séreuses, des cellules de Kuppfer, des cellules endothéliales des sinus veineux de la rate (1). On injecte par exemple, sous la peau d'un rat, 5 à 10 cc. d'une solution de bleu isamine à 1 p. 100 dans l'eau salée physiologique. On renouvelle l'injection une ou deux fois par semaine jusqu'à ce que la peau de l'animal ait pris une coloration bleue. L'animal est sacrifié ; les membranes péritonéales sont examinées à plat sans réactifs ou après fixation par une solution de formol à 10 p. 100. Le tissu conjonctif sous-cutané, des fragments du foie, de la rate, des ganglions sont fixés au formol et débités en coupes après congélation ; les inclusions altèrent les couleurs. Avant de monter les coupes, on peut colorer les noyaux par la safranine, le carmin ou la fuchsine phéniquée. Dans les membranes, les clasmatocytes, les mastzelles, les cellules endothéliales mobilisées (macrophages) ; dans les organes, certaines cellules conjonctives, les cellules endothéliales des sinus des ganglions, les cellules endothéliales des sinus spléniques, les cellules de Kuppfer du foie sont colorées électivement et remplies de grains bleus.

Les couleurs du groupe de la benzidine ne sont pas seules à avoir une pareille propriété. Depuis longtemps, les solutions de carmin ont été employées de cette façon, en injections physiologiques et elles ont le pouvoir de colorer également certaines cellules conjonctives (2). Les injections de collargol donnent des résultats à peu près analogues à ceux qu'on obtient avec les couleurs de la benzidine et colorent électivement les cellules de Kuppfer, les cellules endothéliales des sinus lymphatiques des ganglions et des sinus veineux de la rate, les clasmatocytes des mammifères et les cellules endothéliales mobilisées (3).

(1) Bouffard, *Ann. Pasteur*, XX, 1906. Tschaschin, *Folia hœmatologica*, XVII, 1914. Nakano, *Folia hœmatologica*, XV, 1913. Le trypan bleu colore les granulations oxyphiles des leucocytes dans le sang ou les tissus fixés par le formol, mais le bleu pyrrol ne les colore pas.

(2) Kowalevsky, *Biol. Centralblatt*, IX, 1889.

Cuénot, *Archives de biologie*, XII, 1892 ; XV, 1898 ; XVI, 1900, *Archives d'An. micr.*, I, 1897. Bruntz, *Ann. des sc. nat. Zool.*, XII, 1910. Spillmann et Bruntz, *C. R. Ass. des An.*, Nancy, 1909. Schlecht, *Ziegler's Beiträge*, XL, 1907. Ribbert, *Zeitschrift f. allgem Physiologie*, IV, 1904. Schilling, *Virchow's Archiv*, CXCVI, 1909. Siebel, *Virchow's Archiv*, CIV, 1886. Langeron, *Précis de microscopie*. Tschaschin, *Folia hœmatologica*, XVII, 1913.

(3) Cohn, *Ziegler's Beiträge*, XXXVI, 1904. Gilbert et Jomier, *Archives de méd. exp.* XX, 1908. Nathan, *J. de l'Anatomie*, LXIV, 1908, et *Thèse*, Paris, 1908. Cf. aussi Evans and Scott, *Publication 273 of the Carnegie Institution of Washington*. — Simpson, *University of California Publications in Anatomy*. I, 1921. Möllendorff, *Ergebnisse der Physiologie*, XVIII, 1920.

CHAPITRE II

GLOBULES ROUGES OU HÉMATIES

En examinant à l'état frais le sang de différents vertébrés, nous avons vu qu'il contenait, en grand nombre, des éléments colorés : les globules rouges ou hématies, discoïdes, ovalaires chez la grenouille — arrondis, discoïdes, mais beaucoup plus petits dans le sang de l'homme et des autres mammifères. L'examen de préparations fixées et colorées nous permettra de constater de la manière la plus nette que les hématies de la grenouille ont un noyau, tandis que celles de l'homme n'en possèdent pas : les premières sont des cellules complètes tandis que les autres sont des cellules transformées.

HÉMATIES DES MAMMIFÈRES

Aspect des hématies dans le sang frais de l'homme. Forme extérieure. Agglutinations en piles. — Dans une préparation de sang frais, la plupart des hématies s'agglutinent presque aussitôt pour former des piles qui se réunissent sous des angles variés et dans lesquelles les globules rouges sont vus par la tranche. Il existe toujours un certain nombre de globules qui sont libres dans le plasma, dans les larges mailles du réseau formé par les piles. Quelques-uns flottent ; on peut les suivre dans leurs mouvements et les apercevoir sous différents aspects. Les uns apparaissent comme de petites baguettes, courtes et relativement épaisses, arrondies à leurs extrémités, amincies au centre; ces figures correspondent aux globules rouges vus de profil. D'autres, ovalaires, se trouvent dans une position intermédiaire. Ils tombent lentement; ils sont bientôt immobiles et appliqués sur le fond de la préparation où on peut les observer avec attention et où ils apparaissent arrondis. Ils sont de couleur jaune,

teinte qui vire au rouge lorsque plusieurs globules sont vus superposés. Leur contour est très exactement circulaire. Leur diamètre apparent est de 7 à 8 μ.

Une mise au point attentive permet de reconnaître au centre une tache dont les bords sont estompés et qui paraît tantôt claire, tantôt foncée suivant la mise au point : claire quand on abaisse l'objectif, foncée quand on l'élève. Cette image ne correspond pas à une structure, mais à une simple dépression. C'est en effet l'aspect que prennent les corps concaves dans un milieu moins réfringent qu'eux (globules dans le plasma) — ou les corps convexes dans un milieu plus réfringent, comme les bulles d'air dans l'eau ou les gouttelettes d'eau dans l'huile. La dépression existe sur chaque face, comme il est facile de s'en rendre compte et ce qui est confirmé par l'observation des globules vus de profil.

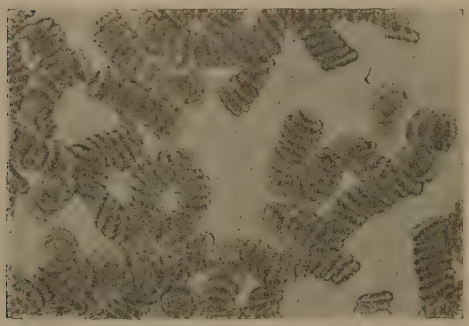


Fig 29. — Homme. Sang frais examiné sans réactifs. Piles de globules rouges. Photographie sans retouches de J. Comandon.

Il résulte donc de ces simples observations que les hématies de l'homme ont la forme de disques aplatis, à bords arrondis, présentant sur chaque face une dépression centrale. Les mêmes constatations peuvent être faites avec le sang du chien et avec le sang d'autres mammifères.

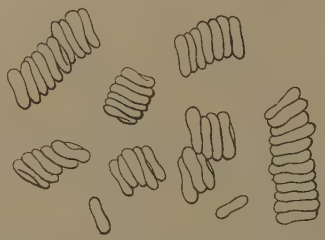


Fig. 30. — Homme. Sang frais examiné sans réactifs. Aspect des hématies dans de courtes piles.

Il existe cependant, dans les préparations de sang frais, quelques globules rouges qui ont une forme différente. Les uns sont homogènes, d'aspect vitreux, réfringents, leur diamètre apparent est plus petit ; la tache centrale n'existe plus. On constate au contraire qu'ils deviennent plus brillants lorsqu'on met au point la surface en relevant l'objectif. Cet aspect est donné par les corps sphériques plus réfringents que leur milieu. Ce sont, en effet, des hématies sphériques encore colorées par l'hémoglobine. Ces globules rappellent un peu l'aspect que donnent les leucocytes, mais ces derniers sont

incolores, plus brillants, plus gros, d'aspect granuleux et leur contour, même au repos, est moins régulier et serti par une ligne foncée.

D'autres hématies sont concaves-convexes, en forme de cupule, de calotte, de cloche ou plus exactement ressemblent à une balle de caoutchouc, dégonflée d'air et dont une partie serait rentrée dans l'autre. Leur coloration et leur réfringence sont restées normales.

Fig. 31. — Hématies de l'homme. Aspect dans le sang frais.

a, hématie vue de face, en abaissant l'objectif; — *b*, la même en éloignant l'objectif; — *c*, hématie vue de profil, 1.200 diam.

Ces modifications de forme des hématies sont connues depuis longtemps. Elles ont presque toujours été considérés comme des altérations artificielles. Dans ces dernières années, certains auteurs ont voulu y voir la forme normale des hématies (1). La question ne souffre pas beaucoup de discussions pour les globules sphériques qui sont des hématies gonflées par absorption de liquide et évidemment altérées; dans beaucoup d'entre elles, l'hémoglobine a déjà commencé à diffuser. La forme en cupule représente une altération beaucoup plus superficielle; elle ne s'accompagne pas de diffusion de l'hémoglobine; elle est reversible, momentanée; elle permet le retour à la forme discoïde biconcave. Elle se produit avec la plus grande facilité, soit dans le sang frais, soit sous l'action des liquides fixateurs, même avec de bons fixateurs de l'hémoglobine, mais elle ne représente nullement la forme normale, la forme d'équilibre de l'hématie (2). Les discussions à ce sujet sont devenues superflues, puisque la question peut être facilement résolue par l'étude des hématies dans le sang circulant.

Fig. 32. — Chat nouveau-né. Mésentère fixé par un mélange chromo-osmique. Forme et disposition des globules rouges dans une courte pile.

Conditions et causes de la formation des piles. — Dans les piles, les hématies, discoïdes, sont assemblées comme des pièces de monnaie; elles se présentent donc de profil, par la tranche; mais ce sont des corps extrêmement mous et élastiques, qui se modèlent les uns sur les autres, sans rigidité. Il est facile de constater leur forme discoïde; mais par la compression, leur concavité est en partie effacée (3). Les piles réunies par leurs extrémités

(1) Weidenreich, *Archiv f. mikr. An.* LXI, 1903; *Ergebnisse der Anatomie*, 1903 et 1904 et *Folia hæmatologica*, 1905.

(2) Jolly, *Soc. de Biologie*, 18 mars 1905 et *Folia hæmatologica*, 1906.

(3) On n'observe presque jamais entre les globules contigus les espaces arrondis correspondant à leur face concave, et qu'on trouve figurés dans les anciens dessins.

forment un réseau à mailles larges, de forme irrégulière. L'extrémité d'une pile peut être libre. Si l'on exerce sur la lamelle, avec la pointe d'une aiguille, de légères pressions, on peut dissocier les piles qui se coupent en tronçons plus ou moins larges. Dans les courts tronçons de piles, en train de se dissocier, les hématies sont souvent situées en position oblique ; parfois encore l'hématie qui termine un tronçon de pile apparaît convexe et présente la forme en cupule.

La dissociation des piles et les courants de liquide qui se produisent dans ces conditions permettent d'apprécier la consistance extrêmement molle, mais en même temps très élastique des hématies ; elles sont entraînées par les courants de plasma comme des gouttelettes fluides qui retrouvent immédiatement leur forme primitive dès que les pressions qu'elles subissaient ont cessé de se faire sentir.

Les piles ne se produisent pas d'une manière absolument constante dans toutes les préparations de sang frais. Avec le sang de l'homme, les piles se produisent presque toujours, si la couche de sang est assez épaisse pour permettre aux globules de flotter librement dans le plasma. Il en est de même avec le sang du chien. Avec le sang du lapin au contraire, les piles ne se produisent que d'une manière inconstante et il en est de même si l'on prend le sang de mammifères possédant des hématies de petite taille ou facilement altérables (rat, souris, mouton, etc.).

Pour que les piles se forment, il faut donc que la couche de sang soit épaisse, que les globules flottent librement et que les hématies ne soient pas modifiées dans leur forme.

Le phénomène avait été attribué autrefois, à la précipitation de la fibrine à la surface de l'hématie (1). Mais les piles se forment dans une préparation faite avec du sang défibriné. Dans les piles, les globules ne sont que juxtaposés : les piles se détruisent spontanément, ou bien on les détruit par une simple pression exercée sur la lamelle. Les piles se forment dans les vaisseaux pendant la vie (2). On peut le démontrer en fixant le sang au moyen d'une injection d'acide osmique à 2 p. 100 dans un segment de veine jugulaire isolé entre deux ligatures (chien ou lapin), ou en examinant le mésentère du chien aussitôt la mort ; mais mieux encore, en examinant les hématies dans le sang circulant.

Le phénomène est purement physique ; il est dû à des phénomènes de tension superficielle, à la tendance qu'ont les corps suspendus dans un liquide à s'accoler par leur plus grande surface. Il peut être reproduit assez exactement avec de petits disques de bois léger, de 2 centimètres de diamètre environ, qu'on leste avec un clou enfoncé dans la tranche, de façon qu'ils soient immergés dans l'eau d'un cristallisoir, en position verticale. Ils flottent en s'accolant les uns aux autres pour former des piles qui réapparaissent presque aussitôt, lorsqu'on les a détruites (3).

L'absence de formation des piles, chez l'homme, a été parfois attribuée à des causes pathologiques. Il est probable que ces observations négatives tiennent surtout aux causes que nous avons signalées plus haut : insuffisance d'épaisseur de la couche du sang, altération des globules. Mais il est possible cependant que les

(1) Dogiel, *Archiv f. An. und Physiol. Phys. Abth.*, 1879.

(2) Weber et Suchard, *Archives de physiologie*, 1880.

(3) Brunton, *XIIIe Congrès int. de médecine*, Paris, 1900. Dans la formation des piles, tout se passe comme si les globules contigus étaient enveloppés par une membrane extrêmement mince, commune, contractile, tendant à donner au groupe d'hématies la surface la plus petite (voir M. Heidenhain, *Folia hæmatologica*, 1904).

modifications de la tension superficielle du plasma exercent une influence sur ce phénomène, d'ordre physique (1).

La formation des piles ne pouvant se produire qu'avec des globules discoïdes, elle a été considérée comme un phénomène artificiel par les auteurs qui décrivent la forme en cupule comme la forme normale de l'hématie. C'est ainsi que le phénomène a été attribué à l'évaporation. Mais cette interprétation n'est pas possible puisque les piles peuvent être observées dans le sang fixé dans les vaisseaux, et même dans le sang circulant.

Observation des hématies dans le sang circulant. — Le mésentère des petits mammifères a été quelquefois utilisé ; mais c'est un objet peu favorable. L'expérience peut être réalisée dans de bonnes conditions avec l'épiploon d'un chien curarisé (2). Mais l'objet le

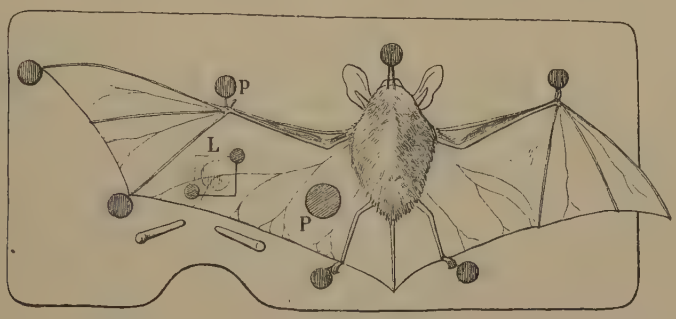


Fig. 33. — Dispositif de l'expérience pour observer la circulation du sang dans l'aile de la chauve-souris. L'animal est couché sur le dos, sur une planchette de bois, percée d'un orifice coïncidant avec l'ouverture de la platine du microscope.

L, lamelle maintenue par deux petits poids de cuivre ; — *P*, poids plus lourd placé sur l'aile, près du corps de l'animal, pour arrêter les vibrations causées par les secousses musculaires de l'aile ; *p*, punaises fixées dans la planchette et auxquelles est fixé l'animal.

plus recommandable est l'aile de la chauve-souris, parce qu'ici, l'animal ne subit aucun traumatisme et qu'on se trouve ainsi à l'abri des principales causes d'erreurs (3).

On choisit de préférence un individu de petite taille, aux ailes minces et peu pigmentées. On le fixe sur une planchette de bois maintenue elle-même sur la platine du microscope. Des ligatures aux deux pattes, aux pouces et à l'extrémité d'une aile sont complétées par la fixation de la tête au moyen de quelques fils attachés aux poils du menton et du front. L'observation microscopique est

(1) Dans le sang, dilué avec des solutions salées et en particulier avec le chlorure de sodium à 7-8 p. 1.000, les piles ne se forment pas. Cela tient probablement à la fois aux modifications des propriétés physiques du plasma et aussi aux altérations de forme des hématies qui se produisent toujours, plus ou moins, dans ce liquide.

(2) Weber et Suchard, *Archives de physiologie*, 1880.

(3) Jolly, *Archives d'An. micr.*, XI, 1909. Cet objet a été choisi d'abord, pour démontrer la préexistence des plaquettes dans le sang des mammifères, par Bizzozero (*Archives italiennes de biologie*, XVI, 1891) et par Laker (*Virchow's Archiv*, CXVI, 1889).

meilleure sur la face ventrale de l'aile ; on fixe donc l'animal sur le dos. On examine l'aile au microscope à un faible grossissement ; on choisit un point convenable ; on peut le recouvrir d'une goutte d'eau glycérinée et d'une lamelle de petites dimensions pour faciliter l'observation et permettre l'emploi de grossissements plus forts. La couche épidermique superficielle protège complètement les tissus de l'aile du contact de l'eau ; la pression de la lamelle est ici insignifiante.

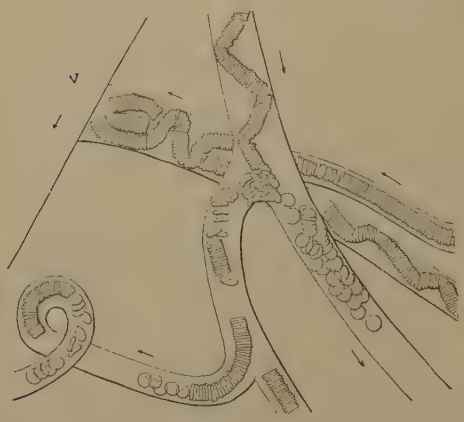


Fig. 34. — Circulation du sang dans l'aile de la chauve-souris. Un des capillaires aboutit à une veine, V. Les flèches indiquent le sens du courant.

La présence du pigment et la réfringence des cellules kératinisées de l'épiderme gênent, au premier abord, l'observation. On ne voit, au début, que le courant sanguin, sans y rien distinguer de net. On choisit un réseau capillaire attenant à une veine ; il est préférable que la veine soit du côté de la source lumineuse afin que sa saillie mette le capillaire observé à l'abri de la lumière directe. On remarque que le courant veineux est intermittent et qu'à des intervalles réguliers, certains segments de la veine se contractent et chassent le sang qui s'était accumulé (1).

La disposition des globules rouges en piles apparaît dans l'intérieur des vaisseaux, pendant la circulation ; on peut presque dire que dans le sang veineux et capillaire, c'est une disposition habituelle des hématies. Dans les capillaires, les globules forment de longues piles qui affectent souvent une marche serpentine, et se brisent contre les éperons de bifurcation des vaisseaux pour se refermer ensuite. Dans les veines, les piles sont brisées en courts tronçons qui persistent, accolés les uns aux autres, pendant la circulation, pour reformer de longues piles, si le courant se ralentit. Les longues piles ne se voient guère que dans les capillaires étroits et dans les veines où la circulation est ralentie, mais l'existence de courtes piles, formées de dix ou douze globules, semble constante dans les veines, quel que soit l'état de la circulation. Dans les artères, la rapidité du courant empêche de distinguer nettement les globules.

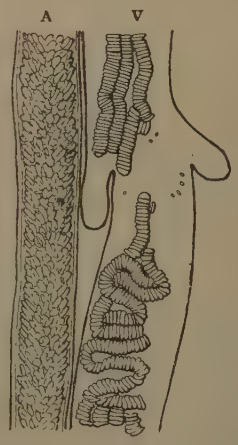


Fig. 35. — Aile de chauve-souris. Fixation *in situ* pendant la circulation.
A, artériole ; — *V*, veinule. 340 diam.

(1) Ces cœurs veineux de l'aile de la chauve-souris, vus depuis longtemps par Warthon Jones, ont été bien décrits par Luchsinger (*Pflüger's Archiv*, XXVI, 1881).

Dans les piles courtes et libres, les globules terminaux sont en général discoïdes. On observe parfois, soit à l'extrémité d'une pile, soit isolé, un globule en forme de cupule ; mais cet aspect semble exceptionnel et la plupart des globules libres, vus de champ, apparaissent avec la forme discoïde, légèrement déprimée. sur les deux faces. Jamais on n'observe de globules sphériques ; ceux-ci n'appartiennent pas au sang normal (1).

On peut obtenir des préparations des vaisseaux de l'aile fixée pendant la circulation. Après avoir observé la circulation en un point favorable, on fixe ensuite cette partie de l'aile en la recouvrant d'une solution d'acide osmique ou mieux d'un mélange chromo-osmique. On laisse les choses en place pendant plusieurs heures, et après s'être assuré que le réactif a pénétré, on découpe cette partie de l'aile et on l'examine dans la glycérine.

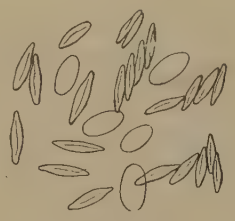


Fig. 36. — Sang de lama examiné sans réactif. 800 diam.

Ces observations de la circulation du sang dans l'aile de la chauve-souris permettent en même temps de constater la préexistence des globulins dans le sang (voir ch. VIII) et la margination des leucocytes (voir ch. V).

Dans des conditions particulières d'éclairage, on peut observer la circulation capillaire dans des régions transparentes, comme l'oreille du lapin, et même chez l'homme, dans les capillaires du lit de l'ongle (2). Mais les globules rouges isolés ne sont pas visibles.

Fig. 37. — Sang de lama examiné à l'état frais. Aspect d'un globule rouge flottant dans le plasma. 2.500 diam.

Agglutination des hématies. — Dans certaines conditions expérimentales, on peut observer une tendance des hématies à s'agglutiner en amas. Ce phénomène est distinct de la formation des piles. Il ne se produit pas dans le sang circulant, ni dans les préparations de sang frais dans les conditions ordinaires de l'observation. Comme l'agglutination des microbes, il est surtout sous la dépendance de modifications physico-chimiques du plasma (voir ch. VIII et IX).

Hématies du chameau et du lama. — Chez les Mammifères, comme nous venons de le voir, la forme normale des hématies est celle de disques circulaires déprimés sur chaque face.

(1) La forme en cupule peut donc être observée, exceptionnellement, dans le sang circulant ; c'est une modification reversible, dont on peut donner, à titre d'hypothèse, l'explication suivante : qu'on suppose le disque limité par une membrane élastique et une hydratation (ou une déshydration) légère et inégale de cette membrane, qui la rende plus courte sur l'une des faces : le globule discoïde prendra l'aspect d'une cupule. Cette tranformation peut se faire, sous les yeux de l'observateur, dans le sang circulant, mais la forme discoïde est l'aspect habituel et représente un état d'équilibre.

(2) E. Weiss, *Deutsches Archiv f. klin. Medicin* CXIX, 1916 ; M. Weiss, *Presse médicale*, 5 février 1921.

Il est pourtant quelques espèces qui font exception. Le sang des Camélides contient en effet des hématies qui ont la forme de disques ovalaires et non arrondis.

Dans les préparations de sang frais, les uns apparaissent très régulièrement ovalaires, ils reposent sur la lame de verre ; ils sont plus pâles, moins réfringents que ceux des Oiseaux et des Poissons ; ils ne présentent aucune trace de noyau. Ceux qui flottent dans le plasma ont l'aspect d'un fuseau. Ils ne sont cependant pas biconvexes, comme on l'a cru longtemps, mais lamelleux et foliacés. Ils ont la forme d'une lamelle extrêmement mince, ovalaire, exactement plane qui, lorsque le globule flotte, a tendance à s'enrouler sur son axe longitudinal (1). C'est ce que l'on constate lorsqu'on suit, au microscope, la chute d'un de ces globules dans la préparation ; au contact de la lame de verre, ils se déroulent et s'aplatissent. Sur les préparations desséchées, ils apparaissent tous de face et ovalaires. On ignore encore pourquoi certains mammifères ont des hématies d'une forme si particulière.

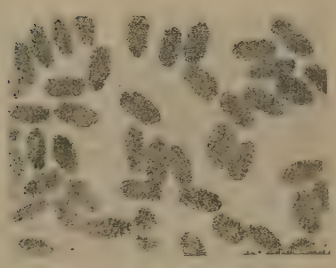


Fig. 38. — Sang de lama, desséché, fixé et coloré. Forme ovalaire des hématies. 750 diam.

Altérations spontanées des hématies dans le sang frais. — Si on conserve pendant plusieurs jours une préparation de sang frais de l'homme, on ne tarde pas à y voir apparaître des modifications des hématies. Ces modifications se produisent assez rapidement dans quelques globules, mais elles ne se sont en général bien accusées qu'au bout de 24 à 48 heures.

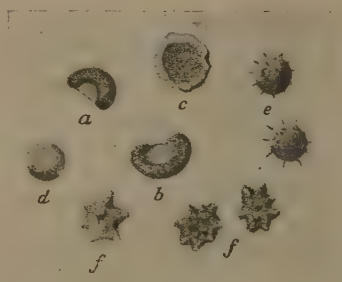


Fig. 39. — Sang d'homme conservé sans réactif. Principales déformations spontanées des hématies.

a, *b*, hématies en cupule ; — *c*, hématie aplatie et crénelée ; — *d*, hématie sphérique ; — *e*, hématies sphéro-épineuses ; — *f*, *f*, hématies épineuses. 750 diam.

Ces altérations spontanées des hématies dans leur propre milieu se produisent beaucoup plus facilement avec le sang de certaines espèces. Elles apparaissent beaucoup plus vite par exemple, dans le sang du

(1) Jolly, *Soc. de Biologie*, 7 février 1920. Ces globules paraissent donc les plus minces, les plus aplatis de tous ceux que l'on connaît ; on peut considérer le fait comme une adaptation heureuse à l'hématose (voir chap. IV).

lapin et dans celui du rat que dans le sang de l'homme et dans celui du chien. D'une manière générale, les petits globules sont plus altérables dans leur forme que les gros.

Les altérations spontanées des globules rouges sont importantes à connaître, pour éviter la confusion avec des altérations pathologiques ; elles sont le point de départ de nos connaisances sur la structure et les propriétés physiques de ces éléments. Elles répondent à quelques types assez simples, qu'il est facile de distinguer.

Un certain nombre d'hématies ont pris une forme en cupule ou la forme sphérique. Les hématies en cupule sont toujours teintes par l'hémoglobine. Parmi les hématies sphériques, il en est de plus ou moins pâles, ce qui tient à une diffusion partielle de l'hémoglobine. Bien que plus épaisses, les hématies sphériques paraissent plus pâles que les autres ; même en admettant qu'il n'y ait eu aucune diffusion de l'hémoglobine, l'hématie est gonflée, a absorbé de l'eau. Elle paraît cependant plus petite ; c'est que son diamètre est diminué, exactement comme celui d'une vessie alternativement vide ou remplie de liquide. Enfin, quelques globules, bien qu'ayant gardé leur forme discoïde biconcave normale et leur couleur, paraissent cependant plus épais quand on les voit de profil. Cette modification est due à un très léger gonflement.

Un certain nombre d'hématies paraissent au contraire aplaties ; leur diamètre est plus grand et elles sont plus pâles. Les unes ont conservé leur forme habituelle ; elles sont seulement plus minces, par suite, un peu moins colorées ; mais elles ont gardé leur réfringence, leur dépression centrale. D'autres, au contraire, paraissent homogènes, plus pâles ; elles se voient dans les préparations où la couche de sang est très mince; on peut les produire artificiellement en exerçant une compression sur la lamelle ; ce sont en effet des globules qui ont été comprimés et qui ont perdu une certaine quantité d'hémoglobine (1). Retenons ce fait important qu'une partie de l'hémoglobine peut diffuser par compression du globule.

Une troisième catégorie d'altérations spontanées concerne des hématies qui ont pris des formes irrégulières : la plus commune est celle d'une sphère, hérissée d'éminences coniques. Ces hématies se produisent avec la plus grande facilité dans le sang frais du lapin. Le globule qui a pris cette forme paraît plus petit ; c'est qu'en effet, par suite du gonflement, son diamètre est diminué. Ces globules sont bien colorés : cela tient à ce qu'il ne s'est produit aucune diffusion de l'hé-

(1) Ces globules sont parfois désignés sous le nom de globules de Norris.

moglobine et aussi à ce que le globule, bien que sphérique, est plus contracté. Quand on met exactement au point en surface, les extrémités des petits cônes apparaissent incolores et brillants ; leur extrémité est arrondie. Dans le sang des espèces qui ont de gros globules, ces éminences peuvent s'allonger davantage ; l'hématie prend alors un aspect plus franchement hérissé ressemblant à un fruit de marronnier. Dans le sang des animaux qui ont des globules très petits (mouton, chèvre), les éminences coniques gardent le même volume que dans les gros globules ; elles sont par conséquent moins nombreuses et l'hématie, au lieu de prendre la forme d'une sphère hérissée, prend la forme d'un solide constitué par l'assemblage de cônes réunis par leur base.

La forme épineuse des hématies n'est pas toujours définitive ; elle peut disparaître spontanément ou sous diverses influences. La même observation peut être faite dans les mélanges de sang et d'eau salée : le retour à la forme discoïde primitive peut s'y produire, soit spontanément, soit par agitation ou centrifugation..

On peut voir aussi, dans les préparations de sang frais, deux autres modes d'altération des globules rouges ; ils sont moins fréquents que les précédents et se produisent surtout sous l'influence des solutions salines et des fixateurs faibles. Certaines hématies ont la forme concave-convexe, légèrement en cupule ; sur les globules vus de profil, on aperçoit une petite sphère transparente, claire, comme enchâssée dans la concavité de l'hématie. Cette petite sphère correspond à un gonflement spécial et limité (1). D'autres hématies qui ont gardé la forme discoïde générale ont un pourtour comme garni de petites perles ; parfois le centre s'est également gonflé en une sorte de bouton sphérique colorable par les couleurs acides. Cette altération, comme la précédente, correspond à des phénomènes de gonflement limités et superficiels (2).

Action de l'eau distillée. — L'addition d'eau distillée à la goutte de sang frais rend les globules sphériques et ne tarde pas à les faire disparaître par diffusion de l'hémoglobine. L'action de l'eau distillée est si énergique que pour l'observer convenablement il faut ajouter le réactif en petite quantité : on fait passer la goutte d'eau distillée sous la lamelle et on observe la zone de diffusion. On peut

(1) Elle a été décrite par Retterer sous le nom de corps anhémoglobique et par Schilling-Torgau sous le nom de corps vitré.

(2) Elle correspond au « corps interne hémoglobinémique » d'Ehrlich, décrit aussi par Heinz dans les globules rouges des animaux intoxiqués par les poisons du sang.

aussi disposer l'une à côté de l'autre, sur la lame, la goutte de sang et une petite goutte d'eau distillée ; en plaçant la lamelle, les deux gouttes viennent au contact ; on observe encore la zone de diffusion. A ce niveau, les hématies se transforment instantanément en de petites sphères régulières ; elles apparaissent comme des billes accolées les unes aux autres et qui roulent dans la préparation ; elles sont homogènes, peu colorées, réfringentes quand on élève l'objectif ; elles pâlissent davantage, puis disparaissent. En même temps, le plasma se colore avec l'hémoglobine qui a diffusé. La destruction des globules se poursuit au fur et à mesure de la diffusion de l'eau. Les hématies ovalaires des Caméliens prennent aussi la forme sphérique par l'action de l'eau distillée.

Fig. 40. — Lama : sang frais. Transformation sphérique des hématies par l'action de l'eau distillée. 350 diam.

Action des solutions salées. — Si, au lieu d'eau distillée, on ajoute à la goutte de sang une solution faible de chlorure de sodium, à 1, 2 ou 3 p. 1.000, la transformation sphérique des hématies se produit encore ; le globule absorbe de l'eau et perd son hémoglobine. Avec une solution plus forte au contraire, à 8 p. 1.000, par exemple, la diffusion de l'hémoglobine ne se produit pas. Si le mélange a été fait avec le sang de l'homme, les hématies gardent assez bien leur forme discoïde ; si l'on a employé le sang du lapin, beaucoup de globules paraissent épineux ; il y a des changements de forme, mais la diffusion de l'hémoglobine ne se produit pas non plus.

En faisant l'expérience en série, dans de petits tubes de verre ou dans des verres de montre, avec des solutions croissant de 1 à 10 p. 1.000, et en employant le sang de l'homme, on constate que la diffusion de l'hémoglobine se produit jusque dans la solution voisine de 5 p. 1.000 et qu'elle ne se produit plus dans les solutions de 5 à 10 p. 1.000. L'addition de chlorure de sodium en proportion déterminée empêche donc la diffusion du pigment sanguin. Des faits identiques se produisent avec d'autres sels (sulfate de soude, sulfate de magnésie, etc.), mais le titre de la solution varie suivant le sel employé.

Ces faits dépendent surtout de la pression osmotique : le globule rouge se gonfle et l'hémoglobine diffuse tant que la concentration moléculaire du milieu reste inférieure à celle du liquide endoglobulaire. Les solutions salées de sels différents qui ont même pression

osmotique et par suite le même effet sur les globules rouges sont dites *isotoniques* (1).

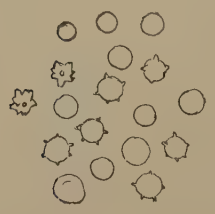


Fig. 41

Fig. 42

Fig. 41. — Sang de lapin mélangé à une solution NaCl à 6 p. 1.000; globules rouges sphériques et épineux.

Fig. 42. — Les mêmes globules replacés dans leur propre sérum. Un grand nombre ont repris la forme discoïde et reforment même de courtes piles.

Dans les solutions NaCl dont la concentration va de 7 à 10 p. 1.000, et qui empêchent la diffusion de l'hémoglobine, un grand nombre d'hématies sont cependant modifiées dans leur forme et deviennent épineuses. Le fait se produit plus encore avec le sang du lapin qu'avec le sang de l'homme. L'altération de forme produite dans les solutions salées est donc jusqu'à un certain point distincte des phénomènes d'hémolyse et indépendante de la concentration saline. Cette altération de forme est sous la dépendance de causes plus compliquées que la seule pression osmotique. Elle n'est pas définitive. L'agitation ou la centrifugation peuvent la faire disparaître. La forme épineuse est reversible, mais la forme sphérique ne paraît plus l'être toujours ou elle l'est plus difficilement; dans ce dernier cas, la structure de l'hématie est en général modifiée.

Fig. 43. — Aspect lamelleux des hématies au contact d'une solution fortement hypertonique. Sang d'homme mélangé à une solution NaCl à 10 p. 100 et examiné à l'état frais. 750 diam.

En replaçant dans leur propre sérum des globules déformés par les solutions salines isotoniques ou légèrement inférieures à l'isotonie, on voit beaucoup de ces globules

(1) Ce terme a été étendu par l'usage. On l'applique en général aux solutions conservatrices, à celles dont la concentration moléculaire est voisine de celle du sérum sanguin (7,5 à 9 p. 1.000 NaCl). Les solutions hypertoniques seront celles d'un titre supérieur. Les solutions hypotoniques seront celles d'un titre inférieur. Ce dernier terme est surtout appliqué aux solutions non conservatrices, c'est-à-dire aux solutions dont le titre est inférieur à la solution limite, inférieur par conséquent à 5 p. 1.000 NaCl (voir chap. IX).

reprendre la forme discoïde normale; ils peuvent reformer de courtes piles (1).

En examinant avec attention ce qui se passe dans les solutions de 7 à 10 p. 1.000, qui toutes empêchent la diffusion du pigment sanguin, on constate que pour le sang de l'homme, c'est dans les solutions voisines de 9 p. 1.000 que la forme et les dimensions des hématies sont en général le mieux conservées. Si l'on étudie l'action des solutions plus concentrées (5, 10, 20 p. 100), beaucoup d'hématies, bien que gardant la forme discoïde, s'aplatissent et augmentent de diamètre et beaucoup se plissent irrégulièrement (2). Tout se passe comme si l'hématie, obéissant aux lois de la pression osmotique,

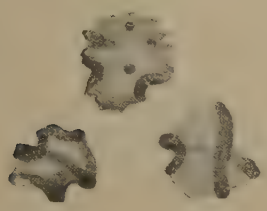


Fig. 44. — Sang d'homme mélangé à une solution NaCl à 5 p. 100. Vapeurs osmiques, hématoxyline au fer. Globules rouges amincis et dont les bords se sont ourlés. 1.500 diam.

Fig. 45. — Même préparation. Hématie aplatie, crénelée et montrant un petit nucléoïde saillant. 1.500 diam.

avait abandonné une partie de son eau au milieu ambiant, plus riche en sel que le liquide endoglobulaire (3). Des hématies, devenues sphériques dans des solutions légèrement hypotoniques peuvent reprendre la forme discoïde quand on les replace dans une solution hypertonique (4).

(1) Voir aussi Hamburger, *Virchow's Archiv*, CXLI, 1895. — Hédon, *C. R. de l'Ass. des An.* Montpellier, 1902, et *Archives de méd. exp.*, 1902.

(2) Malassez, *Soc. de Biologie*, 16 mai 1896.

Pour obtenir les formes lamelleuses des hématies, il faut employer des solutions salées très concentrées (10 p. 100). Dans les préparations, on trouve toujours, à côté des hématies lamelleuses, à bords ourlés, des hématies sphériques et des hématies crénelées et épineuses. Dans les solutions à 2-5 p. 100, beaucoup d'hématies sont sphéro-épineuses ; c'est ce qui explique que Hamburger, qui utilisait des solutions à 2 p. 100, ait constaté constamment une diminution de diamètre dans les solutions hypertoniques tandis que Malassez trouvait une augmentation (voir chap. III).

(3) Lorsqu'on fait ces expériences, il faut tenir compte de l'objet d'étude (espèce animale), et opérer comparativement dans les mêmes conditions de temps et de température. On mélange par exemple dix gouttes de la solution étudiée à une goutte de sang ; on laisse en contact à 15° et on cherche le sédiment après 15 minutes. Il est facile d'obtenir une préparation persistante en la soumettant à l'action des vapeurs osmiques, après avoir enlevé la lamelle.

(4) Froin, *Soc. de Biologie*, 23 mai 1914.

Action de l'urée et de la bile. — Les solutions d'urée mélangée au sang produisent presque instantanément une dissolution des globules rouges avec diffusion de l'hémoglobine. L'addition de bile au sang produit aussi le même résultat. Mais l'action nocive de l'urée et de la bile sur les globules rouges ne se produit pas dans les mêmes conditions et paraît très différente. Les solutions d'urée dissolvent les hématies à toutes concentrations. Mais si l'urée est ajoutée à une solution de chlorure de sodium à 8 p. 1.000, l'hémoglobine ne diffuse plus. Au contraire, la bile, ajoutée à la solution salée, est capable de produire l'hémolyse. Beaucoup d'autres substances agissent de la même façon Tous ces faits seront étudiés au chapitre IX.

Action des fixateurs faibles. — Les réactifs fixateurs employés en solutions très étendues agissent comme les solutions salées faibles : à leur contact, les globules deviennent sphériques, et l'hémoglobine finit par diffuser. Le phéno-

Fig. 46

Fig. 47

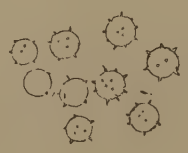


Fig. 48

Fig. 46. — Sang de lapin mélangé *in vitro* à une solution NaCl à 8 p. 1.000. Globules rouges discoïdes et globules épineux.

Fig. 47. — Autre échantillon du même sang mélangé à une solution NaCl à 7 p. 1.000. Hématies en forme de cupules épaisses ; début de gonflement.

Fig. 48. — Troisième échantillon du même sang mélangé à une solution NaCl à 6 p. 1.000. Globules sphériques épineux.

mène se produit dans des solutions d'un titre déterminé, pour un fixateur déterminé. Ces expériences doivent être faites avec des fixateurs non coagulants (acide osmique et formol). On fait, dans des verres de montre ou dans de petits tubes, des mélanges de sang et de solution fixatrice en se servant de solutions de titre décroissant. Après un temps déterminé, on examine le sédiment. Avec les solutions d'acide osmique, on constate par exemple que les hématies ont conservé leur forme discoïde à peu près normale dans la solution à 1 p. 100 — qu'elles sont toutes détruites dans la solution à 1 p. 10.000 qu'elles sont sphériques et en partie hémolysées dans la solution à 1 p. 5.000 (1). Dans les solutions intermédiaires à celles qui produisent le gonflement et à celles qui maintiennent la forme discoïde, par exemple, dans la solution à 1 p. 500, on rencontre les mêmes altérations que nous avons vu se produire dans les solutions salées : épaississement des hématies discoïdes, transformation en cupules à parois épaisses. Ces faits correspondent à un gonflement incomplet que le fixateur n'a pas suffi à empêcher.

En ajoutant, en très faible proportion, un fixateur peu coagulant comme le formol à une solution salée conservatrice (NaCl à 7-9 p. 1.000) on arrive à fixer

(1) Ces chiffres sont donnés simplement pour fixer les idées.

les hématies avec des doses de fixateurs qui seraient insuffisantes si la solution formolée était faite dans l'eau distillée. C'est d'après cette constatation qu'ont été imaginés les liquides employés pour la numération des hématies (voir ch. III).

Un grand nombre de réactifs fixateurs employés en histologie donnent aux globules rouges un aspect granuleux qui paraît dû à une précipitation de l'hémoglobine ou de certaines substances du stroma ; beaucoup de bons fixateurs de l'hémoglobine produisent le même phénomène s'ils sont employés à faible concentration.

Les hématies qui ont été en contact avec des solutions fixatrices très étendues produisant un gonflement, se colorent moins bien par l'éosine et prennent, lorsqu'on étend le sédiment sur une lame et qu'on le colore par une coloration combinée éosine-bleu, une teinte bleuâtre pâle ou violacée, indice d'un certain degré de diffusion de l'hémoglobine. Des modifications de colorabilité du même genre se voient sur les hématies qui ont été au contact des solutions salées faibles.

L'action des liquides hypotoniques sur une préparation de sang qui vient d'être desséchée produit la dissolution de l'hémoglobine d'une manière inégale, en laissant intactes certaines parties du champ de l'hématie qui se colorent ; ces portions qui prennent les colorants acides au milieu d'un globule décoloré sont celles où l'hématie, plus mince, a subi une dessiccation plus intense et où l'hémoglobine a été fixée (1).

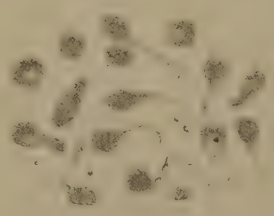


Fig. 49. — Sang d'homme. Altérations produites sur les hématies par une température de 55—60°. 650 diam.

Action de la chaleur. — En étudiant les hématies dans le sang circulant, nous avons pu apprécier leur plasticité et leur élasticité. Ces caractères physiques apparaissent avec la plus grande netteté dans les préparations de sang frais lorsqu'il se produit des courants de liquide.

Cette élasticité est complètement modifiée par l'action de la chaleur, à certaines températures, et dans certaines conditions. Une température assez élevée (100 à 120°) agissant sur le sang étalé sur lame et desséché, n'altère pas les hématies et fixe au contraire leur hémoglobine. Le résultat est bien différent si la chaleur agit sur le sang frais. L'hématie subit alors de profondes modifications, qui se produisent à partir de 52° environ.

On peut faire l'expérience de la façon suivante : une goutte de sang d'homme est reçue sur une lame de verre, et recouverte d'une lamelle. On porte la préparation sur une plaque chauffante à une température d'environ 55° ; on l'y laisse quelques secondes seulement. On regarde ensuite : les globules sont devenus sphériques ; ils sont colorés d'une manière uniforme par l'hémoglobine ; ils paraissent homogènes (2).

Beaucoup de ces globules présentent une dépression centrale plus petite que la dépression des hématies discoïdes. D'autres sont complètement déformés, allongés, en forme de bissac. Enfin un grand nombre présentent à leur surface de petites boules incolores, ou des filaments moniliformes, paraissant quelquefois constitués par un chapelet de sphérules.

Par l'action de la chaleur, les hématies sphériques ont perdu leur consistance

(1) Jolly, *Archives d'An. micr.*, 1907.

(2) Max Schultze, *Archiv f. mikr. Anatomie*, I. 1865. Ranvier, *Traité technique d'Histologie*, 2e éd., 1889, p. 158.

élastique ; elles sont devenues plus fluides et plus altérables, comme il est facile de s'en rendre compte en les observant dans les courants qui se produisent dans la préparation. En exerçant des pressions sur la lamelle avec la pointe d'une aiguille, on fait éclater beaucoup de ces globules et sphérules, exactement comme des gouttelettes de mercure soumises à une compression. Les plus grosses de ces sphérules sont encore colorées, les plus petites sont complètement incolores et sont animées de mouvements browniens. Ces phénomènes se produisent aussi par le seul effet de la température. Finalement les globules sphériques et les sphérules produites à la température de 55 à 60° se décolorent vers 65 à 70°.

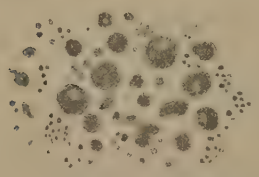


Fig. 50. — Sang d'homme. Altération produite par la chaleur sur les hématies. 650 diam.

Ces phénomènes paraissent dus à la fusion de certaines parties du stroma. On peut obtenir des préparations persistantes des globules ainsi altérés. Après avoir fait agir quelques instants une température de 55–60° sur la préparation de sang frais recouverte d'une lamelle, on enlève celle-ci et on expose la préparation 30 secondes aux vapeurs d'acide osmique ; on immerge dans l'eau, on colore à l'hématoxyline au fer et à l'éosine et on monte au baume. Dans ces préparations, on observe à la périphérie des globules décolorés, un trait plus foncé qui donne l'apparence d'une membrane. Plus rarement, on observe, à la périphérie des sphérules, une zone plus colorée qui a été parfois considérée comme une membrane fluide provenant des portions liquéfiées du stroma.

La charpente des globules modifiés par la chaleur a subi une profonde altération qui apparaît avec évidence dans l'expérience suivante : une goutte de sang est déposée sur une lame, portée un instant à 55-60° de façon à provoquer les altérations que nous venons de décrire ; la goutte de sang est ensuite étalée, puis fixée et colorée par une méthode usuelle. Au lieu de voir, au microscope, des globules à contours circulaires, on observe des hématies très allongées, en forme de baguette. Mais ces globules sont tous allongés dans le même sens. Ce sont en réalité des globules étirés par l'étalement et qui ont pu subir cette déformation parce que leur consistance a été altérée. Il s'agit là d'une altération artificielle. Dans certaines anémies, la charpente de l'hématie subit une modification de consistance qui rappelle un peu celle qu'on produit par la chaleur, mais qui est cependant moins accentuée.

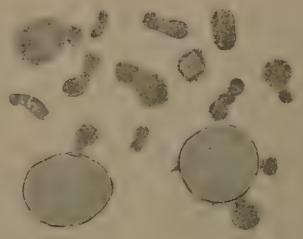


Fig. 51. — Sang d'homme. Action de la chaleur à 55° sur le sang frais. Hématies fixées ensuite par les vapeurs osmiques et colorées par l'hématoxyline au fer. 1.500 diam.

Les altérations dues à la température peuvent être observées sur des globules en suspension dans une solution salée isotonique ; le chauffage à 52° les transforme en sphères. Ces hématies, plongées ensuite dans un milieu hypertonique, ne reprennent plus leur forme discoïde, contrairement aux hématies qui ont été gonflées dans un milieu hypotonique (1).

(1) Froin, *Soc. de Biologie*, 23 et 30 mai 1914. Les hématies devenues sphériques par l'action d'un sérum hémolytique ne reprennent pas non plus la forme discoïde quand

L'action de certaines températures sur la charpente de l'hématie peut encore être appréciée d'une autre manière : on reçoit la goutte de sang sur une lame qui vient d'être chauffée; on la porte quelques instants sur une plaque chauffante à 55°; on étale aussitôt : la couche de sang se dessèche instantanément; on fixe par l'acide chromique et on colore par l'éosine. Au premier aspect, les globules ne paraissent pas modifiés, mais un grand nombre d'entre eux présentent au centre une sorte de gros grain hémoglobique entouré d'un cercle incolore; il s'agit de la portion centrale du disque, plus mince, qui, par suite d'une dessiccation très brusque, s'est détachée et a subi la fusion partielle et la transformation en une sphérule hémoglobique.

Action de la congélation. Action des décharges électriques. — La congélation et surtout les congélations et décongélations répétées produisent la diffusion de l'hémoglobine. L'expérience peut être faite en plongeant dans un mélange réfrigérant une préparation de sang frais bordée à la paraffine (1). Le même action est produite par les décharges d'induction qui semblent agir soit par la chaleur qu'elles dégagent, soit par des phénomènes électrolytiques.

Effet des actions mécaniques. — La compression des hématies provoque une diffusion de l'hémoglobine et donne lieu à la production d'hématies aplaties, homogènes et pâles. Il suffit, pour la produire, d'appuyer sur la lamelle recouvrant la goutte de sang fraîche, avec une aiguille. Par des compressions plus fortes et répétées, on peut arriver à fragmenter les globules.

Si on agite le sang avec des poudres insolubles (sable, verre, pierre ponce, etc.), ou avec du mercure, ou si on le broie avec du sable, on arrive à détruire complètement les globules rouges et à mettre l'hémoglobine en liberté (2).

Fragmentation sous l'influence des réactifs. — Sous l'influence des solutions salées, isotoniques ou hypertoniques, et sous l'influence des solutions fixatrices faibles, on voit se produire à la surface des hématies, de petites saillies globuleuses. Ces petites saillies semblent pouvoir se détacher du globule et devenir libres dans le plasma. Il en est de même pour les extrémités des pointes des globules épineux. Le fait se voit avec la plus grande facilité sur les globules rouges du lapin lorsque le sang a été mélangé à un peu d'eau salée à 7-8 p. 1.000. Un très grand nombre de globules deviennent épineux et si on les observe avec attention, on ne tarde pas à constater que les extrémités des pointes deviennent souvent libres sous forme de petits globules incolores. Le phénomène se voit très bien aussi avec le sang de l'homme, surtout en employant des solutions salées hypertoniques (2 à 10 p. 100). Une fragmentation du même genre, sans hémolyse au début peut être observée sur les hématies épanchées dans la sérosité péri-

on les replace dans une solution fortement hypertonique (8-10 p. 1.000 NaCl) ; le stroma est profondément modifié. (Voir chap. IX.) Les hématies suspendues en milieu isolé isotonique et devenues sphériques par l'action du chauffage à 52° peuvent subir ensuite une fragmentation (globuloclasie) sans hémolyse.

(1) Rollett, *in Stricker's Handbuch der Lehre von den Geweben*, 1871, I, et *Pflüger's Archiv*, LXXXII, 1900. — Ranvier, *Traité technique d'Histologie*, 2e éd., 1889.

(2) Meltzer et Welch, *Centralblatt f. die med. Wiss.*, XXII, 1884 et *J. of Physiology*, V, 1884-85. — Meltzer, *Johns Hopkins Hospit. Rep.* IX, 1900. — Rywosch, *Zentralblatt f. Physiologie*, XIX, 1905.

tonéale, le liquide céphalo-rachidien, et dans la lymphe des sinus des ganglions lymphatiques. Enfin, sous l'influence de la chaleur (à 55-60°), comme nous l'avons vu plus haut, les globules rouges des Mammifères émettent des sphérules incolores et des filaments qui peuvent devenir libres. Les plus gros fragments sont encore colorés par l'hémoglobine, mais les plus petits paraissent tout à fait incolores. Ces fragments et bourgeons, constitués surtout par des substances du stroma, sont donc capables de conserver quelque temps l'hémoglobine fixée sur eux. L'observation des faits de ce genre montre qu'il est impossible de considérer un globule rouge comme constitué simplement par une petite vessie contenant l'hémoglobine à l'état liquide, suivant une conception soutenue encore récemment (1).

Fig. 52. — Globules rouges contenus dans le liquide céphalo-rachidien et fragmentés. Les fragments sont colorés par l'hémoglobine. D'après Froin.

La séparation de bourgeons formés aux dépens des hématies peut encore être observée quand on mélange le sang à des fixateurs en solution très étendue, comme l'acide chromique à 2 p. 1.000 (2). Beaucoup d'auteurs ont voulu voir dans ces corpuscules émis par les globules rouges des restes de noyaux destinés à former les globulins ou plaquettes (voir ch. VIII).

Les modifications de forme et d'aspect que subissent les hématies dans les milieux artificiels, ou par l'action de la chaleur, de l'électricité, etc., ont été parfois attribuées à une propriété contractile, du même ordre que celle qui appartient à tout protoplasme vivant. En réalité, les hématies ne possèdent aucun mouvement propre, rien qui ressemble à l'amiboïsme des leucocytes (3). Seulement il est difficile de comprendre l'aspect mûriforme qu'elles prennent souvent, si l'on n'admet pas dans leur structure des parties douées d'une très grande élasticité ; c'est ce que nous examinerons un peu plus loin.

Altérations cadavériques. — Les altérations des hématies qui se produisent spontanément dans les préparations de sang frais abandonnées à elles-mêmes se produisent aussi dans le sang du cadavre, dans les vaisseaux mêmes. La rapidité avec laquelle elles apparaissent dépend aussi de la température et de la vitesse de la cadavérisation. L'élévation de la température les rend beaucoup plus rapides ; c'est ce qu'on constate en observant le cadavre d'un animal placé à l'étuve à 37°. A basse température, elles sont très lentes ; on peut obtenir des préparations de sang convenables en puisant le sang dans une petite veine, en hiver, sur un cadavre de vingt-quatre heures. Il semble pourtant que, d'une manière générale, ces altérations se produisent plus rapidement que dans le sang recueilli vivant et conservé *in vitro*, à la même température.

Action des réactifs précipitants. — Certains réactifs précipitants, employés couramment en histologie, comme le liquide de Flemming, donnent aux

(1) Weidenreich, *Archiv f. mikr. Anatomie*, LXI, 1903, et *Ergebnisse der Anatomie*, 1903 et 1904.

(2) J. Arnold, *Virchow's Archiv*, CXLV, 1896.

(3) Les jeunes globules rouges nucléés des Batraciens urodèles, à certaines phases de la division indirecte, peuvent présenter de véritables mouvements amiboïdes ; mais il s'agit là de cellules véritables, complètes, nucléées, pauvres en hémoglobine et riches au contraire en protoplasme non différencié.

hématies un aspect finement granuleux. Ces grains, extrêmement fins et nombreux se colorent par les colorants plasmatiques et sont ainsi très distincts des granulations basophiles et des granulations unies en filaments que nous étudierons plus loin. Parfois, on aperçoit, au milieu de l'hématie altérée, des vacuoles plus ou moins nombreuses. Cet aspect est artificiel. Il est dû probablement à une précipitation des albuminoïdes du stroma, tandis que certaines substances lipoïdes s'amassent dans des vacuoles.

Fig. 53. — Hématie de cobaye. Liquide de Flemming, éosine, bleu de méthylène. Aspect granuleux et vacuolé du globule qui est coloré par l'éosine. 1.500 diam.

Nucléoïdes. — Quand on examine, dans le sang frais, avec des grossissements convenables, les hématies de l'homme et des autres mammifères, on n'y distingue absolument aucune structure particulière : la substance du disque, le discoplasma, paraît absolument homogène. L'examen ultra-microscopique du sang (voir ch. VIII) donne exactement le même résultat. Ce n'est pas là, comme on l'a cru quelquefois, une preuve qu'en réalité la structure des globules rouges est homogène, car l'ultra-microscope ne peut distinguer que des corps dont la réfringence est différente de celle du milieu dans lequel ils sont plongés (1). L'examen des préparations du sang bien fixées et colorées ne montre aussi que des hématies homogènes.

Cependant, un grand nombre d'auteurs ont décrit dans les hématies des restes de noyaux. Mais ces restes nucléaires, ou nucléoïdes, ne sont que des artifices de préparation et ne correspondent nullement à des restes de véritables noyaux (2). On a décrit, en effet, comme *nucléoïdes :* le centre du globule gonflé et détaché des parties périphériques par une dessiccation trop brutale ou par l'action de la chaleur ; des portions de stroma encore pourvues d'hémoglobine au milieu de l'hématie décolorée ; des précipités d'hémoglobine ; des apparences artificielles dues à l'adhérence de la couleur basique au centre déprimé de l'hématie dans les colorations combinées, éosine-bleu par exemple ; enfin la production à la surface de l'hématie de ce grain central saillant, en forme

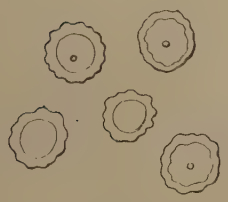


Fig. 54. — Sang d'homme mélangé à une solution NaCl à 10 p. 100 et examiné sans réactifs. Hématies aplaties, crénelées et dont quelques-unes montrent un nucléoïde.

(1) La cornée, examinée à l'état vivant, se montre, au début de l'observation, que bien peu des détails de structure qu'elle contient (voir chap. V).

(2) Jolly, *C. R. de l'Association des Anatomistes*, 7e réunion et 1er congrès int. d'Anatomie, Genève, 6-10 août 1905. — *Archives d'An. microscopique*, XI, 1907.

de bouton incolore, prenant légèrement les colorants nucléaires, ou en forme de vésicule paraissant enchâssée dans la dépression d'une hématie cupuliforme. Ces altérations se produisent dans les liquides hypotoniques ou mauvais fixateurs et même dans les solutions salées hypertoniques ; on les voit aussi à la suite d'un séjour prolongé des globules dans le plasma ; elles peuvent être considérées comme dues à un œdème limité des portions superficielles du globule. Les nucléoïdes, dus à une hydratation, et colorables par les couleurs acides, correspondent aux « corps internes » d'Ehrlich et de Heinz.

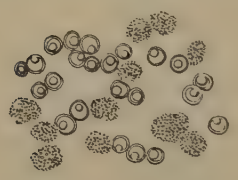


Fig. 55. — Urine humaine. Sédiment. Leucocytes (granuleux) et hématies montrant un nucléoïde d'hydratation.

Fig. 56. — Sang de chien mélangé à du liquide de Marcano. Altérations des hématies. Les deux de gauche sont complètement perforées et transformées en un anneau.

Restes nucléaires. — A côté de ces formations artificielles, il existe pourtant dans les hématies des mammifères des *restes nucléaires* véritables, qu'il est facile de démontrer dans certaines conditions : dans les globules rouges du sang des embryons et des nouveau-nés, chez beaucoup d'espèces : chez l'homme, le porc, le chat, etc., mais particulièrement chez le rat et la souris (1). Ces restes nucléaires vrais se présentent sous l'aspect de petits corps arrondis, dont la dimension très variable ne dépasse pas le plus souvent le dixième du diamètre globulaire, mais peut être bien moindre et atteindre les limites de la visibilité. Ces corps sont le plus souvent isolés, situés au centre d'une hématie ou excentriquement. Exceptionnellement, ils peuvent être doubles ou multiples. Ils se voient dans des hématies bien colorées par l'hémoglobine et ils peuvent prendre toutes les couleurs nucléaires sans

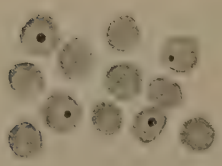


Fig. 57. — Jeune chat. Sang de l'oreille. Restes nucléaires chromatiques. 800 diam.

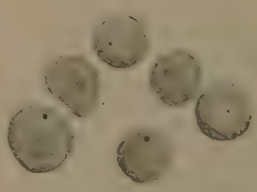


Fig. 58. — Rat nouveau-né. Sang du cœur. Globules rouges contenant des restes nucléaires colorés par l'hématéine. 800 diam.

(1) Jolly, *C. R. de la Soc. de Biologie*, 1er avril 1905, et *Archives d'An. micr.*, XI, 1907.

exception : bleus basiques, safranine, hématoxyline, vert de méthyle. Le plus souvent homogènes, les *restes nucléaires chromatiques* présentent souvent une disposition vacuolée, analogue à celle qu'il est fréquent d'observer dans les noyaux en dégénérescence. Les restes nucléaires vrais peuvent se voir, en petit nombre, dans le sang des anémies graves (voir ch. XVI) au cours des états hémolytiques, et on peut, expérimentalement, provoquer leur apparition dans le sang de l'animal adulte par des hémorragies (1) et par la splénectomie (2). Nous étudierons plus loin leurs relations avec la formation des hématies (3).

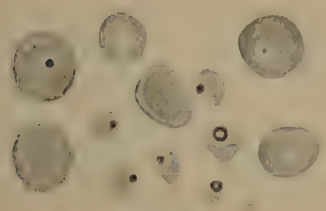


Fig. 59. — Rat nouveau-né. Sang du cœur. Hématies et débris d'hématies contenant des restes nucléaires chromatiques. 800 diamètres.

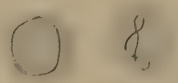


Fig. 60. — Sang humain (anémie pernicieuse). May-Grünwald, Giemsa. Hématies contenant des corps de Cabot. D'après Ferrata.

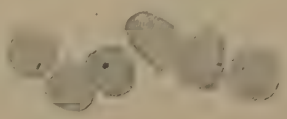


Fig. 61. — Sang d'un fœtus humain de 4 mois et demi. Hématies contenant des restes nucléaires. 800 diam.

Fig. 62.

Jeune rat. Sang du cœur. Hématie contenant un reste nucléaire chromatique en train de se fragmenter. 800 diamètres.

A côté de ces restes nucléaires chromatiques, on peut citer les *corps annulaires* décrits par *Cabot* (4). Ils se présentent sous forme d'un anneau très mince, qui correspondrait aux parties périphériques d'un noyau dégénéré dont le réseau chromatique a disparu. Ils représenteraient donc encore des résidus nucléaires (5).

Fig. 63. — Sang de cobaye. Anémie aiguë post-hémorragique. Hématie contenant un reste nucléaire chromatique. 800 diam.

Comme les restes nucléaires chromatiques, on ne les voit, dans le sang, que dans des circonstances particulières. Ils ont été surtout observés

(1) Jolly et Stini, *C. R. de la Soc. de Biologie*, 22 juillet 1905.
(2) Karlbaum, *Folia hæmatologica*, XX, 1916.
(3) Voir chap. X.
(4) Cabot, *Journal of med. Research*, IX, 1903.
(5) D'après les recherches récentes de Romieu (*S. de Biologie*), 20 mai 1922), ils représenteraient plutôt un appareil périphérique du stroma.

dans le sang des anémies graves (1), mais en étudiant les phases de la disparition du noyau des hématies, pendant la période embryonnaire ,on trouve des aspects assez analogues.

Les *corps en demi-lune* et les *corps en pessaire*, décrits par *Ed.* et *Et. Sergent* dans le sang palustre (2) correspondent à des hématies altérées, partiellement hémolysées. Ces globules ne sont pas particuliers au sang palustre ; on les retrouve aussi dans d'autres anémies.

Fig. 64. — Sang d'homme. Anémie pernicieuse. Hématies portant des restes nucléaires chromatiques. 750 diam.

Formations filamenteuses et granuleuses. — En faisant agir sur le sang frais liquide, diverses matières colorantes, en particulier le bleu de méthylène et le rouge neutre, on obtient au niveau des hématies, l'apparition de grains colorés qui se présentent, soit isolés et disséminés, soit organisés en série linéaires formant des sortes de chapelets et des filaments. Ces figures sont en grande partie artificielles ; elles ne correspondent ni à des grains ni à des filaments préformés ; elles correspondent à de simples précipités de la matière colorante ou à la coloration de précipités formés soit à la surface de l'hématie, soit dans ses couches superficielles. Ces formations artificielles peuvent quelquefois prendre l'aspect d'un réseau (3). Beaucoup de matières colorantes ont été employées de la même façon ; parmi elles, il faut signaler le bleu crésyl brillant avec lequel *Cesaris-Demel* (4) colore, au centre d'un précipité bleu filamenteux, une gouttelette rougeâtre, figurée aussi par d'autres auteurs, et de nature inconnue. Il ne s'agit pas là encore d'une structure véritable, mais probablement de l'élimination,

Fig. 65. — Sang d'homme. Anémie pernicieuse. Hématies portant des restes nucléaires multiples. 750 diam.

(1) Sabrazès, le Globule rouge à l'état pathologique in *Traité du sang de Gilbert et Weinberg*, I, 1913. — Negreiros-Rinaldi, *Morfologia normale e patologica dei globuli rossi*, Napoli, 1916. — Ferrata, *Le emopatie*, I, Milano, 1918. — Ferrata et Vigliolli, *Folia hœmatologica*, XI, 1911. — Gabriel, *Deutsches Archiv. f. Klin. Medicin.*, XCII, 1908.

(2) Sergent, *S. de Biologie*, 16 janvier 1905.

(3) Weidenreich, *Archiv f. mikr. Anatomie*, LXIX, 1906.

(4) Cesaris-Demel, *Archives italiennes de biologie*, XXXVI, 1901, et *Folia h.* 1907. Voir aussi Ferrata, *l. c.*

de la sortie à l'état liquide d'une substance globulaire, probablement lipoïde.

Les aspects filamenteux décrits par *Meves* (1) semblent distincts des précédents. Cet auteur a pu mettre en évidence, dans les globules rouges *nucléés* d'embryons de poulet et d'embryons de cobaye, des formations filamenteuses intra-cellulaires, ayant absolument le caractère de mitochondries. Il les a vues aussi dans les globules rouges nucléés de la moelle osseuse, chez le cobaye adulte. Les filaments sont courts, irréguliers et groupés dans le voisinage du noyau. On les observe, non seulement dans les hématies dont le noyau est encore intact, mais dans les hématies dont le noyau a subi la chromatolyse, et même, dispersés et fragmentés, dans des hématies qui ne présentent plus aucune trace de noyau. Il est fort possible qu'il s'agisse là de formations mitochondriales véritables qui n'existeraient que dans les hématies jeunes, les substances lipoïdes dont les mitochondries sont composées ayant tendance à diffuser et à imprégner d'une façon homogène l'hématie définitive.

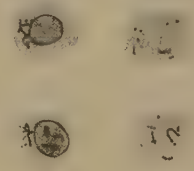


Fig. 66. — Moelle osseuse de cobaye. Flemming, hématoxyline au fer. Globules rouges nucléés et hématies sans noyau ; mitochondries. D'après Meves.

Colorabilité des hématies. Polychromasie. Réaction de Bremer. — Sur les préparations fixées, les hématies de l'homme et des Mammifères prennent avec élection les matières colorantes acides, en particulier l'éosine, l'orange, la fuchsine acide. Elles prennent en général mieux l'éosine que la fuchsine acide, et plus l'orange que l'éosine. Nous verrons l'intérêt de ces variations en étudiant la formation du sang (voir ch. x, xi et xii).

La colorabilité des hématies par les couleurs acides est en général d'autant plus grande que l'hématie est plus chargée d'hémoglobine. Dans les maladies où la quantité d'hémoglobine contenue dans chaque hématie est fortement abaissée (chlorose), les réactions colorantes ne varient pas de quantité, mais les hématies se colorent plus faiblement. Il faut toutefois des abaissements assez grands de la valeur globulaire pour que ces différences soient perceptibles. Dans ce cas,

(1) Meves, *Archiv f. mikr. Anatomie*, LXXII, 1908 et LXXV, 1910. Fixation par un mélange chromo-osmique contenant très peu d'acide acétique et coloration par l'hématoxyline au fer. Pour la coloration des mitochondries dans les éléments du sang, voir chap. v. Pour les mitochondries des globules rouges, voir aussi Shipley, *Folia hæmatologica*,

la portion périphérique, épaisse de l'hématie apparaît seule colorée (1).

Avec les bleus basiques (bleu de méthylène, thionine, toluidine, etc.) les hématies se colorent en vert pâle. L'hématoxyline et l'hématéine employées seules ne les colorent pas ou les colorent en violet très pâle. Il en est tout autrement si l'on a fait agir l'alun de fer auparavant (sur du sang fixé à l'état humide) : dans ce cas, les hématies sont colorées en gris ou en noir. Dans les tissus, sur les coupes, lorsque l'hémoglobine a été bien fixée, les globules rouges sont colorés en noir intense par l'hématoxyline au fer. Cette réaction, qui est à rapprocher de celle des mitochondries, est probablement due autant aux substances lipoïdes de l'hématie qu'à l'hémoglobine.

Dans le sang normal, on peut toujours rencontrer quelques hématies dont les réactions colorantes sont modifiées qualitativement. Ces modifications apparaissent avec beaucoup plus de netteté, et sur un plus grand nombre d'hématies, au cours des anémies (voir ch. XVI). Ces hématies modifiées ont une certaine affinité pour les couleurs basiques : avec les bleus de méthylène, la toluidine, etc., elles se teintent en bleu et non en vert ; dans les colorations combinées éosine-bleu, éosine-hématéine, elles prennent une teinte bleuâtre ou violacée intermédiaire, indice d'une affinité moindre pour la couleur acide. En même temps, le globule rouge a perdu son aspect homogène et paraît très finement granuleux.

Cette altération a été décrite par *Ehrlich* (2) sous le nom de dégénérescence anémique des hématies, et elle a reçu plus tard le nom de polychromatophilie ou de polychromasie qui lui est plus souvent appliqué (3). *Ehrlich* l'a considérée comme due à une nécrose du stroma globulaire. Elle est souvent l'indice d'une quantité d'hémoglobine faible. Dans beaucoup de cas, il s'agit là vraisemblablement de jeunes globules rouges.

Dans le sang des diabétiques, *Bremer* a décrit une modification des réactions colorantes des globules rouges qui porte sur toutes les hématies et non plus sur un certain nombre seulement comme la polychromatophilie. En colorant le sang desséché et fixé par la chaleur à 120° par une solution de rouge Congo ou de bleu de méthyle à

(1) D'où, sur les préparations desséchées, fixées et colorées, l'apparition de globules décrits comme annulaires.

(2) Ehrlich, *Farbenanalytische Untersuchungen*, I, et *Verh. d. Congr. f. inn. Medicin.* XI, Leipsig, 1892.

(3) Gabritschewsky, *Archiv f. exp. Pathologie u. Pharmakologie*, XXVIII, 1891.

1 p. 100 (couleurs acides), on obtient avec le sang normal une coloration rouge ou bleue, suivant le réactif employé ; la lame de sang diabétique, dans les mêmes conditions, reste incolore. En employant de la même façon des solutions contenant des éosinates de bleu de méthylène, les globules du sang diabétique sont incolores, jaunes ou verts tandis que les globules normaux sont, dans les mêmes conditions, roses ou violacés. La présence du glucose dans le sang semble être la cause de ces changements dans les réactions colorantes (1).

Granulations basophiles des hématies. — Chez quelques espèces de mammifères et chez l'homme, au cours des anémies spontanées, on observe, sur les préparations fixées et colorées par des couleurs d'aniline basiques (bleu de méthylène, bleu azur, thionine, toluidine, etc.), des granulations particulières dans un certain nombre d'hématies. Les grains sont nettement teintés en bleu par les matières colorantes citées ; on peut les mettre en évidence par beaucoup de méthodes, en employant soit du sang étalé, desséché, et fixé par l'acide chromique ou l'alcool-éther — ou du sang fixé sans dessiccation par les vapeurs d'acide osmique. Leur forme est arrondie, leur volume et leur nombre, variables. Ils sont souvent situés au niveau de la bordure épaisse du disque, le centre déprimé en étant indemne.

Fig. 67. — Sang de cobaye intoxiqué par la céruse. Dessiccation. Acide chromique. Mélange de Giemsa. Trois hématies à granulations basophiles. 800 diam.

Si on fixe par exemple une préparation de sang frais de cobaye par les vapeurs d'acide osmique, si on colore fortement avec un mélange contenant les éosinates d'azur (2) et si on décolore dans de l'eau à laquelle on a ajouté quelques gouttes d'acide acétique, on obtient facilement des préparations dans lesquelles les hématies sont colorées de la teinte rose pure de l'éosine, et les granulations bleues.

Souvent, cependant, les granulations sont situées dans une hématie colorée en bleu plus pâle ; elles occupent alors, en général, non plus seulement la bordure, mais toute la surface du disque. Leurs affinités pour les matières colorantes sont très distinctes de celles des restes nucléaires que nous avons décrits plus haut. Si elles se

(1) Voir Le Goff, Th. Paris 1897 et *Société de Biologie*, 28 juillet 1900. — Hartwig, *Deutsches Archiv f. klin. Medicin*, LXII, 1899.

(2) Les mélanges de Giemsa peuvent être employés de cette façon.

colorent bien par les bleus de méthylène, le bleu azur, les violets de méthyle et la fuchsine basique, elles n'ont qu'une affinité nulle ou insignifiante pour les couleurs nucléaires les plus énergiques et les plus électives comme le vert de méthyle, l'hématoxyline, l'hématéine, la safranine, qui colorent au contraire très bien les restes nucléaires vrais (1).

Avec le mélange de Giemsa, les restes nucléaires chromatiques se colorent en rouge comme les noyaux, tandis que les granulations basophiles prennent une teinte bleue. Elles n'ont pas non plus les réactions d'une chromatine modifiée comme celles que nous observerons pour les noyaux des hématies en train de disparaître. On peut les mettre en évidence dans les hématies nucléées de l'embryon. Elles peuvent exister dans des globules rouges nucléés à noyau intact (2). Il n'y a jamais aucun rapport entre le nombre des granulations et le degré d'atrophie du noyau. Ce ne sont donc pas des restes nucléaires, et leur origine nucléaire soutenue autrefois par quelques auteurs, est peu admissible (3).

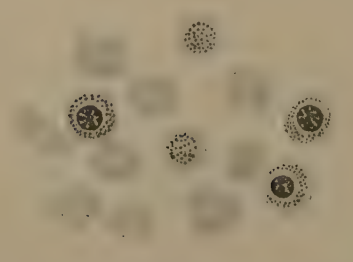


Fig. 68. — Fœtus de cobaye de 40 mm. Sang du cœur. Vapeurs osmiques. Giemsa. Hématies contenant des granulations basophiles. Certaines possèdent un noyau intact. 830 diam.

L'interprétation qui tend à prévaloir aujourd'hui est celle qui veut voir dans ces granulations une modification du discoplasma dans des hématies jeunes, incomplètement évoluées (4) ; cette modification se rapprocherait donc beaucoup de la polychromatophilie, au point de vue de sa nature et de sa signification.

Bien qu'elles existent à l'état normal dans le sang de quelques animaux, comme le cobaye (5), on ne les trouve guère chez l'homme que dans les états anémiques, et chez l'animal, on peut les faire apparaître en plus grand nombre, par les intoxications, en par-

(1) Jolly, *Archives d'An. microscopique*, XI, 1907, et *Archives des maladies du cœur*, mai 1908.

(2) Jolly, *l. c.*, 1907. — Bloch (*Zeitschrift f. klin. Medicin*, XLIII, 1901) a même observé, dans le sang de l'homme atteint d'anémie grave, des hématies nucléées en caryocinèse contenant des granulations basophiles.

(3) Askanazy, *Zeitschrift f. klin. Medicin*, XXIII, 1893 et LXIV, 1907. — Sabrazès (*J. médical français*, IX, 1920) et Ferrata (*Le Emopatie*, I, Milano 1918) après avoir soutenu leur origine nucléaire, les considèrent aujourd'hui comme de nature protoplasmique.

(4) Askanazy, *Zeitschrift f. klin. Medicin*, LXIV, 1907. — Sabrazès, in Gilbert et Weinberg, *Traité du sang*, I.

(5) Jolly et Vallée, *C. R. de la Société de Biologie*, 13 avril 1907.

ticulier, par l'intoxication saturnine chez le cobaye (1) et par des poisons méthémoglobinisants (2). Leur présence coexiste presque toujours avec celle d'hématies polychromatophiles.

Par les méthodes de coloration aux éosinates d'azur (Giemsa, etc.), les granulations basophiles des hématies se colorent en bleu et non en rouge violacé comme les noyaux et les restes nucléaires. On a décrit cependant des granulations azurophiles qui se colorent comme les noyaux et qui ne sont probablement que des restes nucléaires chromatiques multiples, provenant de la fragmentation du noyau de l'hématie (3).

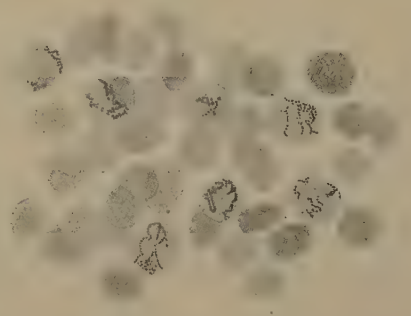


Fig. 69. — Hématies granulo-filamenteuses dans un cas d'ictère hémolytique. Sang mélangé à une solution de bleu polychrome dans l'eau salée. Étalement après centrifugation. 1.000 diam.

Hématies granulo-filamenteuses. — Si, prenant une lame sur laquelle du sang d'homme vient d'être étalé et simplement desséché, on fait agir avant toute fixation une solution aqueuse d'une matière colorante basique (bleu de méthylène, toluidine, fuchsine basique, pyronine, etc.), la plupart des globules perdent leur hémoglobine et se décolorent; mais on en trouve quelques-unes dont le champ est parsemé de très fines granulations faiblement colorées par le réactif. Ces granulations sont le plus souvent réunies en chaînettes, en filaments et en réseau, d'où le nom d'hématies granulo-filamenteuses qui a été donné à ces éléments pour les distinguer des hématies à granulations basophiles. Les couleurs d'aniline sont très légèrement fixatrices, leurs solutions aqueuses agissent comme les solutions salées hyponiques.

La production de ces globules granuleux spéciaux est due probablement à une hydratation ; mais c'est un artefact qui concerne des hématies particulières. Ces hématies finement granuleuses paraissent en effet correspondre, au moins en partie, aux globules polychroma-

(1) Sabrazès, Bourret et Léger, *XIIIe Congrès int. médecine* et *J. de Phys.*, 1900.
(2) Sabrazès, *J. médical français*, IX, 1920.
(3) Ferrata, *Le Emopatie*, Milan, 1918. — Noegeli, *Blutkrankheiten*, Leipsig, 1920. Avec la méthode de Giemsa, les hématies polychromatophiles se colorent en général en bleu ; parfois elles se colorent en une teinte violacée rappelant celle des noyaux ; cette polychromatophilie spéciale (polychromatophilie azurophile), a été considérée par Ferrata comme résultant de la dissolution de la chromatine nucléaire.

tophiles. Pour les mettre nettement en évidence, on peut faire agir la matière colorante, non plus sur le sang étalé ou desséché, mais sur des globules suspendus en solution salée isotonique. On reçoit quelques gouttes du sang à examiner dans un tube à centrifuger contenant une solution de chlorure de sodium à 8 p. 1.000, fortement colorée par du bleu polychrome ou de la toluidine (1). On centrifuge, et le culot globulaire, émulsionné avec une pipette est étalé sur lame et desséché. Après fixation à la chaleur, on examine avec un objectif à immersion.

L'intérêt de ces éléments se trouve dans le fait qu'ils existent en grand nombre dans le sang des malades atteints d'ictère hémolytique (2) (ch. IX et XVI). On ne peut les obtenir par l'hémolyse *in vitro*. Mais si, comme *Widal* et ses collaborateurs l'ont fait, on injecte de l'eau distillée dans les veines d'un lapin, on voit apparaître dans le sang de nombreuses hématies granulo-filamenteuses visibles dans le sang non fixé. Dans le sang fixé du même animal, on voit qu'il existe des hématies polychromatophiles et peu ou pas d'hématies granulo-filamenteuses.

Ces granulations ne préexistent donc pas dans les hématies (3), mais elles sont l'indice d'une modification réelle ; on tend aujourd'hui à considérer les hématies qui les portent comme des hématies jeunes et à voir, dans leur apparition en grand nombre dans le sang, un symptôme de régénération.

Les hématies granulo-filamenteuses ne peuvent être obtenues qu'en colorant le sang frais (coloration dite vitale) ; mais les préparations ainsi colorées peuvent être ensuite fixées.

L'aspect spécial des hématies granulo-filamenteuses, les conditions particulières de technique dans lesquelles on les obtient, permettent de les distinguer facilement des hématies granuleuses (granulations

(1) On peut aussi se servir d'une solution chlorurée oxalatée. WIDAL, ABRAMI et BRULÉ (*Soc. de Biologie*, 21 mars 1908) recommandent la solution suivante : Eau salée à 10 p. 100 : 1 centimètre cube ; solution d'oxalate de potasse à 2 p. 100 : 1 centimètre cube ; bleu polychrome, XX gouttes. On peut aussi faire évaporer sur une lame une goutte d'une solution alcoolique à 1 p. 20 de bleu crésyl brillant ; déposer une gouttelette de sang et examiner. (FIESSINGER et ABRAMI, *Revue de médecine*, XXIX, 1909.)

(2) CHAUFFARD et FIESSINGER, *Société méd. des hôpitaux*, 8 novembre 1907. — WIDAL, ABRAMI et BRULÉ, *Soc. méd. des hôpitaux*, 29 novembre 1907. — FIESSINGER et ABRAMI, *Revue de médecine*, 1909. — BRULÉ, Th. Paris 1909. — SABRAZÈS et LEURET, *Soc. de Biologie*, 14 mars 1908.

(3) Les véritables granulations basophiles ne semblent pas non plus préexister dans l'hématie ; sans être des artifices grossiers, elles ne correspondent probablement pas à une véritable différenciation structurale. Il est bien probable qu'elles représentent une altération peu éloignée de la polychromatophilie ; mais ces relations ne sont pas encore éclaircies. On peut rencontrer dans les hématies parasitées, des granulations spéciales dont nous parlerons au chapitre XVI.

basophiles des hématies). De plus, lorsqu'elles apparaissent dans les cas pathologiques, elles sont toujours en nombre beaucoup plus grand que les hématies à granulations basophiles.

L'aspect particulier des hématies granulo-filamenteuses n'est pas dû à une lésion du globule propre aux ictères hémolytiques ; car on peut voir apparaître ces éléments dans le sang indépendamment de toute fragilité globulaire et de tout processus hémolytique (1). Elles sont abondantes dans le sang après la saignée et au cours d'anémies de diverses causes. Dans le sang des animaux anémiés, quel que soit le mode expérimental employé (saignées, injections de poisons du sang, injections d'eau distillée, de sérum hémolytique), elles ne sont abondantes que quelques jours après le début de l'anémie ; leur apparition retarde sur la destruction globulaire.

La substance qui se colore par les colorants basiques dans les hématies granulo-filamenteuses n'est probablement pas identique à celle des granulations basophiles ; elle en est seulement voisine ; en tout cas, ces deux substances sont très distinctes de la chromatine (2).

Par une méthode spéciale d'imprégnation à l'argent, *Golgi* a pu mettre en évidence, dans les globules rouges des Mammifères, un corpuscule double qu'il considère comme un double centrosome persistant, analogue à celui qui peut être mis en évidence dans les globules rouges nucléés, pendant la mitose, aux extrémités du fuseau (3).

Poïkilocytose. — Le diamètre des hématies, chez les Mammifères, pour une espèce donnée, est très constant ; de plus, dans un même sang, très peu d'hématies s'écartent par leurs dimensions, du diamètre moyen. Dans le sang de certaines anémies, dans la chlorose par exemple, les dimensions des hématies deviennent très irrégulières (anisocytose). De plus, beaucoup de globules présentent des aspects bizarres ; ils apparaissent munis d'un prolongement irrégulier paraissant capable de se fragmenter et l'on trouve dans la préparation des globules extrêmement petits, teints par l'hémoglobine,

(1) Brulé, Th. Paris, 1909.

(2) Certains auteurs ont considéré les véritables granulations basophiles comme formées par les substances non colorables du noyau ; la substance granulo-filamenteuse correspondrait à une membrane lipoïde (voir Ferrata, *Folia hæmatologica*, IX, 1910, et Pappenheim, *Folia hæmatologica*, IX, 1910). On peut arriver à colorer, dans le même globule, les granulations basophiles, la substance granulo-filamenteuse et les restes nucléaires chromatiques (Ferrata et Boselli, *Folia hæmatologica*, X, 1910). Ce sont donc trois choses distinctes. La substance granulo-filamenteuse a été considérée comme due à une précipitation de certains colloïdes du stroma ; c'est l'hypothèse la plus vraisemblable ; ce seraient les mêmes substances sous un autre état physique qui prendraient la couleur basique dans les hématies polychromasiques.

(3) Golgi, *Hæmatologica*, I, 1920.

qui semblent provenir de la segmentation des globules piriformes (schistocytes). Ces petits globules conservent souvent la forme discoïde biconcave originelle de l'hématie.

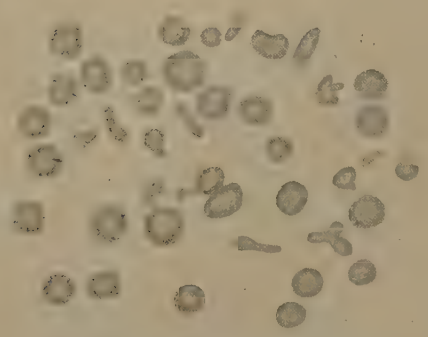


Fig. 70. — Chlorose. Sang desséché, fixé et coloré. Poïkilocytose. 650 diam.

Cette altération décrite sous le nom de poïkilocytose par *Quincke* (1) est réelle ; ce n'est pas un artefact. Toutefois, elle est bien moins apparente dans le sang frais que sur les préparations de sang desséché ; de plus, les déformations sont toujours beaucoup moindres sur les préparations qui ont été fixées, sans dessiccation, par les vapeurs osmiques. C'est que ces globules ont une consistance modifiée. Ils sont plus mous, moins élastiques. Ils se laissent plus facilement déformer par les actions mécaniques. Il faut donc voir dans cette altération une modification du stroma globulaire qui, bien que différente, se rapproche cependant des altérations produites par une température de 55° à 60°.

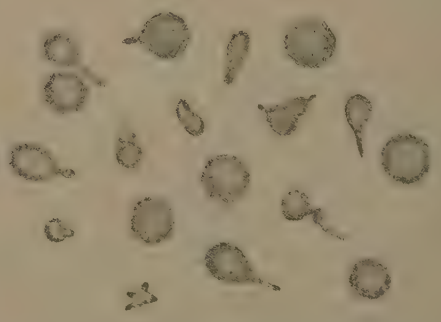


Fig. 71. — Sang d'homme. Anémie post-hémorragique. Fixation après dessiccation. Déformations globulaires. 750 diam.

Cristaux et cristalloïdes intra-globulaires. — Chez certains animaux, on peut observer, dans le sang frais, la formation de cristaux d'hémoglobine dans l'intérieur du globule rouge ; on peut assister à la transformation directe d'une hématie en un petit groupe de ces cristaux. Cette altération, facile à voir dans le sang du rat et du chien, par exemple, se produit spontanément, dans le sang conservé *in vitro ;* elle est favorisée par l'évaporation et la concentration. Cette altération n'est pas réversible, elle paraît définitive.

Le stroma et la membrane. Hypothèses sur la constitution de l'hématie. — Lorsqu'on traite du sang par de l'eau distillée ou par une solu-

(1) Quincke, *Deutsches Archiv. f. Klin. Medicin.*, XX, 1877.

tion salée hypotonique, l'hémoglobine diffuse; mais du globule rouge, il reste quelque chose, une sorte de squelette, le *stroma*. Le stroma peut être mis en évidence dans une préparation de sang frais d'homme : on fait passer une goutte d'eau distillée sous la lamelle ; on observe la zone de diffusion; les hématies deviennent sphériques, pâlissent fortement; on aperçoit cependant encore leurs contours. Si l'on ajoute une goutte d'une solution concentrée de chlorure de sodium (à 10 p. 100), les stromas sont plus visibles : ils apparaissent discoïdes, lamelleux, ou épineux, comme les hématies dans les solutions salées concentrées; mais ils sont décolorés, leurs contours sont souvent peu nets et beaucoup d'entre eux forment des masses indistinctes. Les stromas ainsi obtenus peuvent être fixés et colorés : on constate qu'ils prennent très légèrement les couleurs nucléaires (1).

Pour l'observation histologique des stromas, on peut employer encore des solutions salées légèrement hypotoniques, et fixer ensuite le sang avec les vapeurs d'acide osmique. On peut employer aussi directement des fixateurs très dilués. On laisse dessécher sur lame une petite goutte du dépôt et on colore ensuite.

Lorsqu'on observe au microscope l'action de l'eau distillée sur les hématies, les stromas obtenus ne sont pas limités par une ligne réfringente; le globule semble s'être simplement décoloré; il n'apparaît pas comme une vésicule dont la paroi aurait éclaté. Lorsqu'au lieu d'eau distillée, on ajoute au sang une solution faible d'acide acétique (à 1 p. 100), le stroma apparaît limité par un contour brillant.

Suivant l'idée qu'on s'est faite de la structure du stroma, les opinions ont varié sur la constitution de l'hématie. Certains auteurs pensent que le globule rouge est un corps homogène; d'autres le représentent comme une vésicule limitée par une membrane renfermant l'hémoglobine liquide (2). Dans ce cas le stroma est identifié à la membrane. Un plus grand nombre d'auteurs admettent que l'hémoglobine est supportée par une charpente alvéolaire très réduite, plus serrée à la périphérie et formant à la surface une pellicule, une croûte ou une membrane; dans les mailles de ce feutrage se trouve l'hémoglobine, soit à l'état de dissolution, soit combinée chimiquement au stroma (3).

L'hypothèse qui fait du globule rouge une simple vésicule, limitée par une membrane et contenant l'hémoglobine à l'état de solution, est assurément trop simple. Elle ne peut expliquer un certain nombre de faits, en particulier la

(1) Pour obtenir les stromas en plus grande quantité, on mélange du sang défibriné à plusieurs volumes d'une solution de sel marin à 1 p. 100. Par des centrifugations répétées et en enlevant la couche superficielle des leucocytes et des globulins, on arrive à séparer complètement les hématies qui sont ensuite hémolysées par addition d'une quantité suffisante d'eau distillée. Les stromas sont précipités par addition d'une solution concentrée de sel marin ou de sulfate acide de sodium.

Les globules rouges contiennent des substances fixes et de l'eau, cette dernière en quantité deux ou trois fois plus considérable. L'hémoglobine forme les 8 ou 9/10 du globule sec. Dans la constitution du stroma entre une substance albuminoïde incolore, la globuline ; de la cholestérine, des lécithines, des substances minérales : potassium, chlore, magnésium, sodium chez quelques espèces, phosphore sous forme de nucléines dans les globules rouges nucléés, et aussi chez les Mammifères. Quant au fer, il ne paraît exister que sous forme d'hémoglobine.

(2) Weidenreich, *Ergebnisse der Anatomie* de Merkel et Bonnet, XIII. 1903. Cette manière de voir a été encore soutenue récemment par Romieu (*S. de Biologie*, 14 janvier 1922).

(3) Rollett in *Manuel d'histologie* de Stricker.

conservation de l'hémoglobine dans des fragments de globules obtenus par la chaleur ou par des actions mécaniques.

L'existence d'une membrane a été admise comme nécessaire pour expliquer les actions osmotiques qui se passent au niveau des globules rouges. Mais une membrane *histologique* différenciée n'est pas absolument indispensable pour expliquer ces actions. En tout cas, les phénomènes de gonflement et d'aplatissement des globules par les actions osmotiques peuvent se concevoir aussi bien en représentant l'hématie constituée par une charpente alvéolaire qu'en la représentant absolument creuse. Lorsqu'on fixe, par simple dessiccation sur lame, du sang de mammifère, on peut ensuite, au moyen de solutions aqueuses de violet de gentiane, de violet de méthyle, etc., colorer à la périphérie de l'hématie hémolysée un mince cercle qui a été considéré comme une membrane (1). Cet aspect peut être obtenu aussi par la fixation du sang frais.

Si on laisse déposer une goutte de sang dans une solution osmique à 1 p. 10.000, et qu'après avoir laissé sécher ensuite une goutte de ce mélange sur une lame, on colore à l'hématoxyline au fer, on aperçoit dans les globules hémolysés un cercle gris, qui se trouve un peu en dedans de la limite de l'hématie. La transformation rapide de l'hématie discoïde en hématie cupuliforme, la transformation de l'hématie en sphère épineuse et le retour facile à la forme première, s'expliquent plus facilement en supposant l'existence d'une membrane. On peut supposer qu'elle reste unie à la paroi opposée par de fins tractus élastiques qui permettent le retour à la forme première tant qu'ils ne sont pas rompus (2).

Quant à l'hémoglobine, sa diffusion par la compression ou par d'autres actions mécaniques, parle contre l'hypothèse d'une combinaison chimique avec le stroma. On a donc supposé qu'elle était à l'état liquide, dissoute comme les sels dans l'eau du stroma. Mais la faible solubilité de l'hémoglobine parle contre cette hypothèse, car la quantité d'hémoglobine contenue dans l'hématie est trop grande pour être dissoute dans l'eau qu'elle renferme (voir ch. IV). Il faudrait admettre l'existence d'une solution sursaturée.

Lorsqu'on suit au microscope la diffusion de l'hémoglobine dans l'eau distillée ou dans d'autres solutions hémolytiques, on voit les globules devenir sphériques ; puis ils pâlissent, mais il n'y a ni éclatement ni déchirure comme on l'admet quelquefois. Lorsqu'on examine dans l'eau salée à 10 p. 100 les stromas de globules hémolysés dans l'eau distillée, on voit des stromas discoïdes, aplatis, plissés ou ratatinés ; mais ils ne représentent pas la paroi d'un sac qui aurait éclaté (3). L'hémoglobine diffuse donc comme une substance qui imbiberait tout le stroma. Il est donc probable que l'hémoglobine est fixée sur le stroma sous forme d'une

(1) Detjeen, *Virchow's Archiv*, CLXV, 1901. — Weidenreich, *An. Anzeiger*, XXIV, 1903. — Herzog, *Archiv f. mikr. Anatomie*, LXXI, 1908.

(2) Meves (*An. Anzeiger*, XXIII, 1903) admet l'existence d'une membrane, mais perforée en différents points pas de petits orifices.

(3) Dans les solutions salées fortement concentrées, les stromas sont donc encore sensibles aux influences osmotiques. Mais rien de pareil ne s'observe si les stromas ont été touchés par un sérum hémolytique. Lorsqu'on ajoute le sel, ils gardent leur forme primitive, régulièrement sphérique (Bordet, *Immunité*, 1920). Il y a donc des circonstances où le stroma est altéré par l'hémolyse. L'étude comparative au microscope de l'hémolyse par l'eau distillée, la bile, les sérums hémolytiques montre que la sortie de l'hémoglobine ne se fait jamais par éclatement du globule, mais que la séparation de l'hémoglobine s'accompagne, dans certains cas, de la désintégration de certaines substances du stroma (voir chap. IX).

combinaison physico-chimique lâche, qui n'est ni une solution, ni une véritable combinaison chimique (voir ch. IV et ch. IX). Le pigment forme un complexe avec les substances du stroma.

L'étude des colloïdes a modifié en effet nos idées sur la nature de l'hémolyse et nous permet d'envisager d'une nouvelle manière la constitution du globule rouge. Les analyses chimiques nous montrent l'hématie formée en grande partie d'hémoglobine et reposant sur un support ou stroma constitué essentiellement par des substances protéiques et des lipoïdes (cholestérine, lécithine, etc.). Tous les faits connus tendent à nous montrer l'hémoglobine unie à ces deux ordres de substance en combinaison physico-chimique. Les substances protéiques forment une charpente réticulée, plus serrée à la périphérie et qui constitue la membrane que l'on aperçoit parfois sur les globules hémolysés. Dans les mailles de ce stroma protéique se trouvent les lipoïdes qui existent aussi dans la pseudo-membrane ; car si on traite par un solvant des lipoïdes les globules hémolysés par exemple par une solution très étendue de sublimé, l'anneau qui limite l'hématie pâlit et devient granuleux (1). L'hémoglobine est adsorbée à ce stroma.

On conçoit, d'après cette structure, que la diffusion de l'hémoglobine puisse être due à des actions très variées, des causes multiples pouvant détruire le complexe et séparer ces diverses substances : adsorption des lipoïdes à des substances inertes pulvérulentes, fusion ou dissolution des lipoïdes, précipitation des protéiques, etc. Beaucoup d'agents hémolytiques produisent du reste la destruction du complexe par des actions multiples.

De tout ceci, nous conclurons que la théorie de la constitution du globule rouge des Mammifères qui explique le mieux les faits aujourd'hui est celle qui représente le stroma constitué par une trame excessivement lâche provenant du protoplasme de la cellule d'origine, condensée à la périphérie. Ce stroma alvéolaire ou feutré est probablement très réduit au centre. Il contient dans ses mailles l'hémoglobine unie à des albuminoïdes et à des lipoïdes en combinaison physico-chimique (2).

Globules rouges nucléés des Mammifères. — Chez l'embryon des Mammifères, le sang est d'abord formé uniquement par des cellules hémoglobiques nucléées (3). Les hématies sans noyau n'apparaissent qu'à un stade relativement avancé du développement. Les hématies définitives représentent des cellules complètement transformées qui ont perdu leur noyau. Le cytoplasme s'est transformé, et, comme celui de la fibre cristallinienne, il s'est adapté

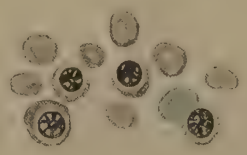


Fig. 72. — Rat adulte. Sang de l'oreille. Globules rouges nucléés. 800 diam.

(1) Bechhold et Kraus, *Bioch. Zeitschrift*, 1920. — Bechhold, *Münchener med. Woch.*, 4 février 1921.

(2) Dans ces dernières années, quelques auteurs ont décrit au globule rouge des Mammifères une structure excessivement compliquée ; ils ont voulu y retrouver les différentes parties d'une cellule absolument complète. (Voir en particulier Schilling-Torgau, *Folia hæmatologica*, XIV, 1912.)

(3) Voir chap. X et XI.

plus étroitement à sa fonction, qui doit persister un certain temps après la disparition du noyau.

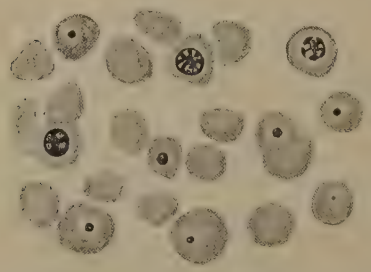


Fig. 73. — Porc âgé de 7 mois. Sang de l'oreille. Globules rouges nucléés et restes nucléaires chromatiques. 800 diam.

Des globules rouges nucléés existent encore à la naissance, en très petit nombre, dans le sang de la circulation générale, chez l'homme et chez presque tous les mammifères. Relativement nombreux chez le rat, la souris, le porc, le chat, etc., ils sont plus rares chez l'homme, le chien, le lapin, etc., où ils disparaissent assez vite.

Il existe pourtant quelques espèces de mammifères chez lesquelles des globules rouges nucléés existent constamment, en très petit nombre il est vrai, dans le sang de l'animal adulte : rat, chat, porc, sanglier (1). On peut en trouver aussi, mais plus exceptionnellement, chez le lapin et chez le chien. Ces hématies ont le volume des hématies sans noyau ; leur noyau, ordinairement arrondi et unique présente un réseau chromatique assez serré ; parfois la chromatine est condensée en une masse presque homogène. Chez le chat, le rat, le porc, on trouve, à côté de ces globules rouges nucléés, des hématies portant des restes nucléaires chromatiques de différentes dimensions. On peut en trouver aussi dans le sang des jeunes enfants ; mais ils y sont rares.

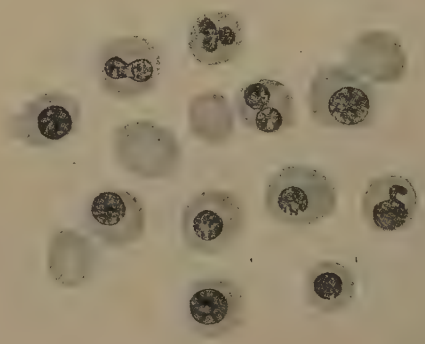


Fig. 74. — Sang d'homme ; anémie aiguë post-hémorragique. Différents aspects de globules rouges nucléés (normoblastes). 800 diam.

Fig. 75. — Cobaye saigné. Sang du cœur. Mégaloblaste en mitose. 1.125 diamètres.

Chez l'homme adulte normal, on ne trouve dans le sang ni globules rouges nucléés, ni restes nucléaires. Les globules rouges nucléés n'apparaissent qu'à la suite des

(1) Jolly, *Société de Biologie*, 10 novembre 1906.

hémorragies ou dans les états pathologiques (voir ch. XVI et XVIII). Ils répondent à deux types principaux : les uns ont le volume des hématies normales; leur noyau arrondi, ou parfois en forme de bissac ou de trèfle, possède un réseau chromatique serré, souvent condensé (pycnose); ils sont riches en hémoglobine et se colorent comme les hématies sans noyau (1). D'autres, plus volumineux, ont un noyau relativement plus grand, à réseau chromatique moins serré, et un cytoplasme moins riche en hémoglobine, présentant souvent les modifications de colorabilité de la polychromatophilie (2).

Fig. 76. — Sang d'homme. Myélocytémie. Mégaloblaste. 1.000 diam.

HÉMATIES DES BATRACIENS

Les Poissons, les Batraciens, les Reptiles et les Oiseaux possèdent des hématies nucléées discoïdes et elliptiques. C'est chez les Batraciens qu'il faut d'abord les étudier, parce qu'ici, ces éléments atteignent des dimensions considérables qui facilitent beaucoup les observations microscopiques : un globule rouge de grenouille atteint 23 μ de long, trois fois le diamètre d'un globule rouge de l'homme ; celui d'un triton atteint 30 μ. Ceux de la salamandre, de l'axolotl (40 μ), du protée (60 μ) sont de dimensions plus considérables encore et peuvent être distingués à la loupe.

Dans une préparation de sang frais de grenouille, les hématies apparaissent toutes allongées. Beaucoup se présentent de face : elles sont elliptiques ; au centre, on aperçoit une tache claire ovalaire qui correspond au noyau. D'autres sont vues de profil ; elles ont l'aspect d'un fuseau renflé au centre. Ce sont donc des disques minces, elliptiques, renflés au centre sur chaque face. Ces éléments ont une tendance à s'accoler les uns aux autres par leur grande surface, mais ils ne forment pas de piles. Lorsque dans la préparation, des courants de liquide les entraînent avec rapidité et les choquent les uns contre les autres, on constate avec la plus grande facilité que ce sont des corps très mous, très flexibles, mais en même temps très élastiques, revenant instantanément et exactement à leur forme première, dès que les compressions qu'ils subissent ont cessé de s'exercer. Les hématies sont transparentes, comme on le voit lorsqu'elles sont

(1) Ils correspondent aux *normoblastes* d'Ehrlich.
(2) Ils répondent aux *mégaloblastes* d'Ehrlich.

superposées ; le disque, en dehors du noyau, paraît absolument homogène.

Ces résultats, obtenus par l'examen direct du sang frais, peuvent être confirmés par l'observation du sang dans les vaisseaux mêmes, soit qu'on examine simplement des membranes fraîches, soit mieux qu'on observe *in vivo* le sang circulant (1).

Fig. 77. — Sang de Triton conservé *in vitro* depuis trois semaines et examiné sans réactifs. Déformations des hématies produites par la rupture de la strie bordante.

Altérations spontanées dans le sang frais. — Si l'on abandonne à elle-même, à la température du laboratoire, une préparation de sang frais de grenouille ou de triton, on ne tarde pas à y observer des globules rouges dont l'aspect est modifié.

Ces altérations concernent la forme et la couleur. Un grand nombre d'hématies s'effilent à l'un des pôles qui, au lieu de rester arrondi, forme un angle plus ou moins aigu. Parfois cette extrémité est comme tordue sur elle-même ; plus souvent elle s'effile ; il n'est pas rare de voir le globule prolongé par un filament assez long qui est incolore et qui peut même, exceptionnellement, se bifurquer. Cette altération se produit presque toujours à l'un des pôles seulement : les hématies prennent la forme d'une mandoline. On peut quelquefois l'observer aux deux pôles. Le corps cellulaire des hématies qui ont subi cette altération de forme a gardé sa couleur hémoglobique et le noyau est encore visible.

Fig. 78. — Sang de triton mélangé à de la lymphe péritonéale. Les hématies elliptiques ont pris la forme sphérique.

D'autres globules, moins nombreux, sont devenus sphériques et pâles ; le noyau apparaît brillant et arrondi, l'hématie est limitée par une sorte de fine membrane brillante. Le contenu de la cellule est absolument transparent ; on y aperçoit parfois quelques grains réfringents animés de mouvements browniens ; la cellule a perdu complètement son hémoglobine. D'autres hématies perdent leur hémoglobine d'une manière plus lente et un peu différente : on voit se former à l'un des pôles une boule assez grosse

(1) Voir la technique de l'examen du sang circulant dans le mésentère au chapitre v.

qui pâlit, se décolore et semble même quelquefois se détacher. Parfois, il se forme plusieurs de ces boules, et l'hématie prend un aspect mûriforme.

La rapidité de ces altérations dépend de la température et de la manière dont la préparation a été faite. Lorsque la préparation a été faite proprement et qu'elle est maintenue à une température basse (0° à 10°), les hématies se conservent longtemps. Les altérations de forme, ici, comme chez les Mammifères, précèdent l'hémolyse.

Fig. 79. — Sang d'axolotl mélangé à de l'humeur aqueuse du même animal et examiné sans réactifs. Fragmentation des hématies en sphérules encore colorées par l'hémoglobine. 300 diam.

Dans certains globules, l'hématie, piriforme, présente au pôle acuminé, un bourgeon allongé constitué par le noyau. Celui-ci paraît avoir quitté le globule auquel il est uni par un court pédicule dont la substance se continue autour de lui. Un certain nombre d'hématies contiguës peuvent subir cette altération ; elles forment une sorte de rosace dont la partie centrale est occupée par les noyaux agglutinés; le corps cellulaire a conservé son hémoglobine.

Enfin la cellule peut être divisée en deux moitiés contenant chacune une portion de noyau. Ces figures en forme de bissac, qu'on peut retrouver dans les préparations fixées, ne répondent pas à des figures de division cellulaire directe, mais représentent une altération. Parfois les globules, sans perdre leur hémoglobine, prennent l'aspect muriforme et se fragmentent en sphérules qui finalement, se décolorent.

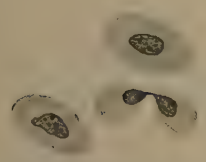


Fig. 80. — Sang de lézard (*Lacerta agilis*) fixé et coloré. Hématies fausse division directe. 800 diam.

Dans le sang de tous les animaux qui possèdent des globules rouges nucléés elliptiques, on peut observer des faits du même ordre. Ces altérations se produisent plus facilement lorsque le sang est mélangé à de la lymphe ou à de l'humeur aqueuse.

Action de l'eau. — L'eau distillée produit, sur les globules rouges de la grenouille, une action rapide et brutale qu'on peut observer en faisant passer sous la lamelle une petite goutte d'eau distillée et en observant la zone de diffusion. Les globules se gonflent, deviennent sphériques et se transforment en petites sphères contenant un noyau brillant souvent excentrique et limité par une sorte de fine

membrane réfringente. En ajoutant une trace de vert de méthyle ou de violet de méthyle, ce noyau se colore.

Si, au lieu d'eau distillée, on fait passer sous la lamelle un peu de bile, qu'il est facile de prendre avec une pipette dans la vésicule biliaire, on voit les hématies se détruire rapidement. En ajoutant, au lieu de bile, une goutte de lymphe ou une goutte d'urine, la diffusion de l'hémoglobine ne se produit généralement pas.

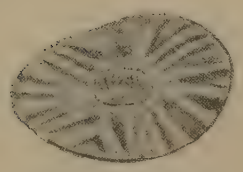


Fig. 81. — Action d'une solution hypertonique sur les hématies. Sang de salamandre mélangé à une solution NaCl à 5 p. 100. Globule rouge montrant des plissements superficiels. 750 diam.

Action des solutions salées. — Comme chez les Mammifères, les solutions salées très faibles (1 à 3 p. 1.000 NaCl) font diffuser l'hémoglobine. En faisant l'expérience en série, avec des solutions de titre croissant de 1 à 10 p. 1000, on constate, comme chez les Mammifères, que pour un sel donné la diffusion de l'hémoglobine s'arrête dans une solution d'un titre déterminé. Ici, le titre de la solution limite est inférieur à celui qu'on trouve chez les Mammifères ; la solution isotonique avec le sérum sanguin est, chez les Batraciens, voisine de 6 p. 1.000 NaCl tandis qu'elle est d'environ 9 p. 1.000 chez les Mammifères (voir ch. IX).

Les solutions hypertoniques, à un degré de concentration suffisante, produisent des plissements et des ratatinements des globules. Les solutions hypotoniques les gonflent, comme l'eau distillée.

Action de l'alcool faible. — L'alcool faible (1) produit sur les hématies de la grenouille une action spéciale : l'hémoglobine diffuse, mais les globules, bien que décolorés, gardent leur forme elliptique. Si à l'alcool au tiers on a ajouté un peu de vert de méthyle ou de fuchsine basique, les noyaux se colorent vivement. L'alcool faible produit donc une diffusion de l'hémoglobine, comme l'eau distillée, mais plus lente et non accompagnée d'une transformation sphérique de la cellule.

D'autres réactifs fixateurs, employés à faibles titres produisent des effets analogues. Ils fixent certaines parties de la cellule, la maintenant dans sa forme, empêchent son gonflement brutal par l'eau, mais ne peuvent s'opposer à la diffusion de l'hémoglobine. Beaucoup produisent à la surface du disque un précipité granuleux.

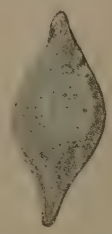


Fig. 82. — Sang de salamandre. Hématie. Déformation produite par une solution hypertonique (NaCl à 5 p. 100). 750 diamètres.

Action de la chaleur. — Une température d'environ 55° agissant sur le sang frais, non desséché, produit des altérations assez voisines de celles que nous avons étudiées chez les Mammifères. Les globules présentent des bosselures ; il se fragmentent en sphérules, encore colorées par l'hémoglobine, mais dont la consistance est plus fluide et moins élastique que celle des globules intacts. Ces sphérules finissent par se décolorer complètement.

(1) L'alcool au tiers de Ranvier, fait en ajoutant à un volume d'alcool à 90° deux volumes d'eau distillée.

Les congélations répétées produisent un effet du même genre. Il en est de même de la décharge d'un condensateur.

Phénomènes de contraction des hématies. — Si, au lieu de prendre le sang d'une grenouille, on a recueilli, frais, entre la lame et lamelle, le sang d'une salamandre ou d'un triton, on observe très souvent le phénomène suivant (1). La préparation vient d'être faite avec les précautions habituelles ; la plupart des hématies ont un aspect globuleux et non elliptique. Le globule rouge est comme contracté et ramassé sur lui-même ; la surface est irrégulière, comme plissée grossièrement. L'hématie n'a rien perdu de son hémoglobine, elle paraît même plus colorée, ce qui tient à son état de contraction. Une observation attentive montre que l'apparence plissée de la surface est due à la bordure du disque qui, revenue sur elle-même, entoure d'une crête sinueuse la partie centrale, globuleuse, de la cellule (2).

Si, après avoir abandonné la préparation, on l'observe de nouveau après un quart d'heure ou une demi-heure, on constatera souvent que presque tous les globules ont repris leur forme normale, discoïde et elliptique. La modification décrite n'est donc pas définitive ; elle est momentanée ; elle permet le retour à la normale, sans lésion, sans sortie apparente d'hémoglobine. On peut assister au microscope à ces phénomènes : la contraction se fait assez brusquement ; le déplissement est plus lent et progressif. Parmi les globules qui présentent cette curieuse propriété, il en est qui, incomplètement déplissés, sont comme tordus à une de leurs extrémités et forment une boucle. D'autres sont divisés en travers, en deux parties égales, par une sorte de rétrécissement plissé.

Tout se passe, dans ce phénomène, comme si la portion plane, périphérique de l'hématie, le disque, subissait une très légère contraction ou un raccourcissement, et comme s'il était en même temps limité par un cercle élastique capable de s'infléchir mais non de se raccourcir.

Structure des hématies. La strie bordante. — La plupart des aspects bizarres que présentent spontanément les hématies des Batraciens dans le sang frais s'expliquent en effet par l'existence d'une sorte de cercle élastique périphérique plus résistant que le reste du globule et sur lequel celui-ci se trouve comme tendu et maintenu dans sa forme. Cette *strie bordante*, aperçue par *Ranvier* (3), en 1875 et considérée par lui comme une membrane, a été vue plus tard par *Dehler* (4) et par *Nicolas* (5), et bien mise en évidence par *Meves* (6) qui en a montré la véritable signification.

(1) Le phénomème est plus net et plus généralisé avec le sang du triton. Il ne se produit pas avec le sang de la grenouille ou bien il est extrêmement atténué.

(2) Brücke, *Sitz. d. K. Akad. d. Wiss. Wien.* LVI, 1867. — Knoll, *Sitz. Ak. Wien.*, 1896. — Meves, *An. Anzeiger*, 1903 et 1904 et *Archiv f. mikr. Anatomie*, LXXVII, 1911. — Comandon et Jolly, *Journal de physiologie et de pathologie gén.*, XVII, 1917-18.

(3) Ranvier, *Archives de physiologie*, 1875.

(4) Dehler, *Archiv f. mikr. Anat.*, XLVI, 1895.

(5) Nicolas, *Bibliographie anatomique*, IV, 1896.

(6) Meves, *An. Anzeiger* 1903 et 1904 et *Archiv f. mikr. Anatomie*, LXXVII, 1911.

Ce cercle élastique est très visible, dans le sang frais de la salamandre et du triton, sans le moindre réactif. La strie apparaît sous forme d'une sorte de bourrelet périphérique, de cordon, très distinct surtout lorsqu'il s'est transformé en une boucle à l'extrémité de l'hématie. Un grand nombre des modifications spontanées de l'hématie sont conditionnées par l'existence de ce cercle élastique. Si l'on suppose une contraction du discoplasma, la strie oppose d'abord à la déformation une certaine résistance ; mais elle finit par s'infléchir en un point, et comme elle ne peut diminuer de longueur, l'inflexion se fait en dehors du plan du disque. La contraction continuant, le disque se recroqueville et la strie, suivant le mouvement qui l'attire, apparaît, sur l'hématie ratatinée et globuleuse, comme une collerette ondulée, comme un cordon sinueux. Si la contraction cesse, la strie, par suite de son élasticité, reprend peu à peu sa forme et c'est elle alors qui entraîne le disque et le déplisse.

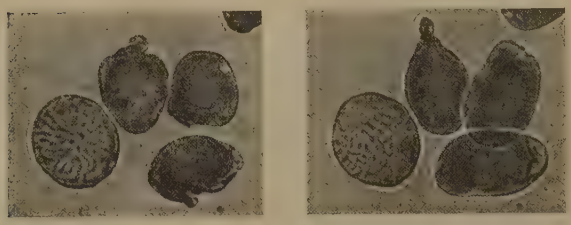


Fig. 83. — Sang de triton examiné sans réactifs. Deux phases successives de la contraction et du déplissement de trois hématies. A gauche, phase de contraction; à droite, phase de déplissement. A côté des trois hématies, un érythroblaste en mitose; à gauche, fin de la prophase, étoile mère; à droite, métaphase, fin de l'ascension polaire, plaque équatoriale. Entre les deux images, il s'écoule 22 minutes. Température : 22°. 700 diam. Cinéphotographies sans retouches. D'après Comandon et Jolly, 1917.

Fig. 84. — Globule rouge de salamandre en état de contraction. Au bout de quelques heures, ce globule était revenu à la forme elliptique dont le contour est indiqué par une ligne pointillée. D'après Meves.

La nature de ce mouvement de contraction n'est pas connue. Ce n'est probablement pas une contraction protoplasmique vitale, active, mais plutôt un phénomène passif, dû au gonflement des parties centrales du disque qui raccourcit les diamètres de l'hématie et attire la strie. Il faut vraisemblablement en chercher la cause dans des modifications momentanées, très légères, de la tension superficielle du plasma et de l'équilibre osmotique entre l'hématie et son milieu.

Dans le sang frais, et sans l'addition de réactif, la strie peut par-

fois se rompre. Le phénomène se produit en général au niveau d'une boucle, d'où l'aspect effilé et bizarre des hématies que l'on constate fréquemment dans le sang conservé depuis quelques jours *in vitro*. On peut même observer parfois la strie complètement isolée : elle apparaît comme un filament réfringent auquel restent encore attachés des fragments globuleux du disque, fragments encore colorés par l'hémoglobine. Ces phénomènes peuvent aussi être observés en mélangeant le sang à une solution forte de sel marin (3 à 5 p. 100). Le discoplasma apparaît troué et se détache de la strie.

Fig. 85. — Sang de salamandre examiné frais sans réactif. Déformation spontanée produite par la torsion de la strie bordante. 750 diam.

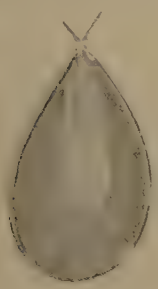


Fig. 86. — Sang de salamandre. Hématie. Altération spontanée produite par la rupture de la strie. 750 diam.

Méthodes pour mettre la strie en évidence. Coloration. — La méthode la plus simple pour colorer la strie bordante consiste à ajouter, sur la lame, à une goutte de sang frais de salamandre ou de triton, une goutte de solution de violet de gentiane à 1 p. 200. On peut aussi utiliser le violet de méthyle, le violet cristal et le violet dahlia. La strie apparaît avec la plus grande netteté et on remarque qu'elle se dissocie en fibrilles parallèles.

Pour obtenir des préparations persistantes, le mieux est de fixer le sang étalé et encore humide par un mélange chromo-osmio-acétique (1) ; on colore énergiquement par l'hématoxyline au fer, — par le violet de gentiane après mordançage par la teinture d'iode — par la safraninе — par la double coloration safranine-hématéine — ou enfin par la triple coloration safranine-gentiane-orange. Dans ces préparations, la dissociation de la strie en fibrilles parallèles est parfois visible ; ces fibrilles apparaissent, par places, réunies par de fines membranes transversales.

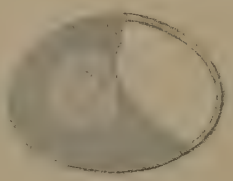


Fig. 87. — Sang de salamandre mélangé à une solution de NaCl à 5 p. 100. Hématie dont le discoplasma s'est rompu et séparé de la strie bordante. 750 diam.

Action des acides. Structure fibrillaire de la strie. — Certains acides, employés en solution étendue, produisent sur les hématies des Batraciens un gonflement particulier et mettent en même temps la strie bordante en évidence.

Après avoir recueilli entre lame et lamelle une goutte de sang de salamandre,

(1) La présence de l'acide acétique est ici utile. Le mélange faible de Flemming convient très bien (acide chromique à 1 p. 100 : 25 centimètres cubes ; acide osmique à 1 p. 100 : 10 centimètres cubes ; acide acétique à 1 p. 100 : 10 centimètres cubes ; eau distillée : 55 centimètres cubes).

on fait passer sous la lamelle une goutte d'une solution d'acide acétique à 1-10 p. 100 et on observe la zone de diffusion. L'hématie, dont l'hémoglobine a diffusé, se bombe sur les deux faces et prend l'aspect d'une noix ou d'un œuf de Pâques. La présence de la strie, qui est nettement visible, comme le noyau, a empêché le gonflement de se produire dans les autres directions.

Fig. 88. — Sang de salamandre examiné sans réactif. Altération produite par la rupture spontanée de la strie. A droite, hématie normale ; à gauche, hématie dont la strie est rompue ; le discoplasma est fragmenté en corps sphériques, colorés par l'hémoglobine et supportés par un filament incolore et réfringent qui est la strie bordante. La sphérule centrale contient le noyau. 750 diam.

Dans le sang de la grenouille traité de la même façon, on observe encore une augmentation d'épaisseur de l'hématie, mais vue de profil, elle n'a plus la forme d'une lentille, mais celle d'un sablier; on observe en effet, autour du noyau, un appareil filamenteux qui unit les deux faces du disque et a empêché le gonflement de se produire à ce niveau.

Pour empêcher l'action gonflante de la solution acide d'être trop brutale, il vaut mieux y ajouter du chlorure de sodium. La solution suivante donne des résultats excellents :

Solution de NaCl à 1 p. 100.	100 cc.
Acide azotique pur. . . .	XXX gouttes

On dépose sur la lame une goutte de cette solution et, à côté, une goutte de sang de salamande ou de triton; on recouvre d'une lamelle et on observe la zone de diffusion : les préparations obtenues de cette façon sont extrêmement démonstratives (1). L'hématie, décolorée, a pris la forme d'une noix ; la strie apparaît avec la plus grande netteté. Sur les hématies vues de face, la strie bordante apparaît très épaissie et formée d'un grand nombre de fibrilles concentriques, réunies par des lignes transversales dirigées suivant les rayons de l'ellipse, et qui donnent l'impression de membranes d'union analogues à celles qui traversent les faisceaux musculaires striés. Sur les globules vus de profil, la surface extérieure de la strie apparaît granuleuse. Cet aspect granuleux de la strie se verra quelquefois mieux en remplaçant l'acide azotique par l'acide iodique (2).

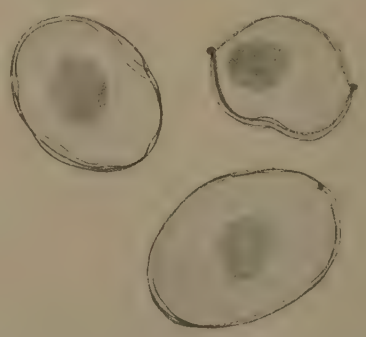


Fig. 89. — Sang de salamandre mélangé à une solution de violet de gentiane. Coloration et dissociation de la strie bordante des hématies. 650 diam.

(1) Meves, *Archiv f. mikr. An.*, 1911. Ces préparations ne sont pas persistantes. On peut ajouter à la solution acide une petite quantité de fixateur, 1 p. 100 de sublimé par exemple, qui limite le gonflement.

(2) Chlorure de sodium 1, acide iodique 2 à 4, eau 100 centimètres cubes. Meves explique l'aspect granuleux de la strie en admettant l'existence d'une bandelette spé-

Les hématies ovalaires sans noyau du lama paraissent aussi limitées par une strie bordante qui rappelle celle des Batraciens, mais elle est infiniment plus mince (1). On peut la mettre en évidence à l'aide d'une solution salée à laquelle on ajoute un peu d'acide azotique (2). Les hématies perdent leur hémoglobine ; beaucoup gardent leur forme ovalaire et paraissent limitées par un filament excessivement mince, souvent sinueux, qu'on peut colorer par l'hématoxyline au fer.

Fig. 90. — Sang de salamandre fixé à l'état frais par du sublimé acétique. Strie bordante colorée par l'hématoxyline au fer. 1.000 diam.

Stries de Kneuttinger. Raies de Hunefeld-Hensen. — En mélangeant une goutte de sang de salamandre à une solution salée fortement hypertonique (5 p. 100 NaCl par exemple), on observe des globules rouges présentant des radiations autour du noyau. Elles sont formées par de légers plis. Mais si on prolonge l'observation, et si, au lieu d'eau salée, on se sert d'une solution de saccharose à 10-12 p. 100, on constate que la portion centrale de la cellule devient globuleuse tandis que la partie périphérique devient très pâle et membraniforme. Ces figures, vues d'abord par *Hünefeld*, puis par *Hensen*, *Kneuttinger*, *Brücke*, ont donné lieu à des interprétations différentes, et ont été le point de départ de théories diverses sur la structure de l'hématie.

Fig. 91

Fig. 92

Fig. 91. — Salamandre maculée. Modification des hématies produites par l'addition au sang d'une solution chlorurée contenant de l'acide azotique. Globule rouge en forme de noix et vue de profil ; strie bordante. 1.000 diam.

Fig. 92. — Même préparation. Hématie vu de face, et aplatie entre la lame et la lamelle. Structure fibrillaire de la strie. 1.000 diam.

Brücke supposait l'hématie formée par une masse incolore poreuse (« l'oïkoïd ») renfermant dans ses mailles l'hémoglobine (le « zooïd »). Dans le phénomène précédent, les deux substances se séparaient sous une influence inconnue. *Hamburger* (3) comparait le phénomène à la plasmolyse.

V. Ebner (4) en donna la véritable explication en disant qu'il s'agissait d'un gonflement des parties centrales du globule, la périphérie du disque opposant une résistance au gonflement. La découverte de la strie bordante est venue démontrer l'exactitude de cette inter-

ciale, de structure granuleuse, appliquée à la face externe de la strie. Sur les globules vus de profil, le strie paraît quelquefois n'être pas à la limite de l'hématie, mais un peu en dedans de sa surface ; cet aspect est artificiel et tient à l'aplatissement du globule.

(1) Jolly, *Soc. de Biologie*, 7 février 1920.

(2) Solution de NaCl à 1 p. 100 : 10 centimètres cubes ; acide azotique : III gouttes.

(3) Hamburger, *Archiv f. Anatomie und Physiologie.* Phys. Abth. 1887 et 1898.

(4) Ebner, *Kölliker's Hanbbuch der Gewebelehre*, 6e éd. III, 1902.

prétation. Les figures de *Hünefeld-Hensen* paraissent des altérations définitives (1).

Action des vapeurs d'ammoniaque. — Les vapeurs d'ammoniaque produisent sur les globules rouges des Batraciens, des boucles de la strie bordante qui ressemblent à celles qu'on observe dans le sang de ces animaux, sans réactifs, mais qui sont plus accentuées. Pour faire agir les vapeurs, on retourne la lame ou lamelle qui a reçu la goutte de sang, au-dessus d'une chambre humide profonde ou au-dessus d'un petit flacon contenant la solution ammoniacale diluée. Lorsque l'action des vapeurs a été suffisante, la strie peut se tordre plusieurs fois sur elle-même, la torsion arrivant à détacher des fragments du discoplasma, qui prennent la forme sphérique. Finalement, les hématies se gonflent et l'hémoglobine diffuse.

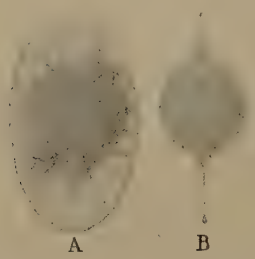


Fig. 93. — Sang de salamandre mélangé à une solution de sucre de canne à 12 p. 100. Globules rouges montrant les figures de Hünefeld-Hensen.

A, hématie vue de face ; — *B*, hématie vue de profil. D'après Meves.

Structure interne de l'hématie. Structures artificielles. Formations mitochondriales. — Beaucoup d'auteurs, à l'aide de méthodes différentes, ont obtenu, dans les hématies des Batraciens, l'apparition de granulations, de réseaux, de filaments qui ont été décrits comme appartenant à la structure du globule rouge. La plupart de ces aspects correspondent à des artifices de préparation, c'est-à-dire à des précipitations, à des coagulations causées par les réactifs, et non à des objets préexistants.

Il en est ainsi par exemple de l'aspect granuleux que prennent les hématies avec beaucoup de fixateurs (alcool faible, solution saturée d'acide picrique, sublimé saturé acétifié à 5 p. 100, etc.). Il en est de même des figures irrégulièrement réticulées obtenues par l'emploi du rouge neutre, du bleu de méthylène mélangés directement à la goutte de sang fraîche, ou par l'emploi du tannin.

Fig. 94. — Salamandre maculée. Hématie. Formations métachondriales. Mélange chromo-osmique. Safranine, gentiane, orange. 1.000 diam.

Il existe cependant quelques faits d'observation qui parlent en faveur d'une différenciation structurale intérieure de l'hématie des Batraciens. Dans le sang mélangé à une solution salée contenant de l'acide azotique (voir plus haut), certains globules montrent des filaments incurvés qui ont la même réfringence que les menbranes transversales de la strie. Des filaments analogues peuvent être observés avec une solution d'acide iodique à 4 p. 100 à laquelle on ajoute un peu de violet de méthyle. On peut en voir aussi dans le sang fixé frais sur lame, au moyen d'un mélange chromo-osmique et en colorant énergiquement ensuite à l'hématoxyline au fer, ou par la triple coloration safranine-gentiane-orange. Ils paraissent mieux développés chez

(1) Meves, *Archiv f. mikr. Anatomie*, LXXVII, 1911, p. 465.

les Anoures que chez les Urodèles. Ils sont plus abondants dans les globules rouges embryonnaires. *Meves* en a figuré de très caractéristiques dans les hématies de l'embryon du poulet (1). Il a pu aussi en mettre en évidence dans les hématies nucléées des Mammifères (2).

L'aspect de ces filaments, la concordance des résultats obtenus avec des méthodes différentes permettent d'y voir des faits de structure véritables ; il s'agit là vraisemblablement de *formations mitochondriales*.

Quand on fixe le sang frais des Batraciens avec un fixateur coagulant contenant un acide, par exemple le sublimé acétique, on voit se produire parfois, dans un grand nombre d'hématies, de nombreuses vacuoles limitées par des cloisons ou des membranes anastomosées. Ces membranes, dues à une coagulation des albumines du stroma, coagulation qui limite le gonflement, peuvent être facilement colorées par l'hématoxyline au fer ; certaines d'entre elles, à la suite de l'éclatement des vacuoles à la surface, paraissent ondulées. Il est possible qu'un certain nombre de structures filamenteuses et réticulées décrites soient en rapport avec des faits de ce genre (3).

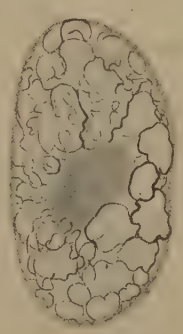


Fig. 95. — Sang de salamandre fixé par le sublimé acétique et coloré par l'hématoxyline au fer. Hématie dans laquelle des membranes de précipitation très colorées simulent des formations mitochondriales. 1.000 diam.

Fig. 96. — Embryon de poulet du 3e jour. Hématie primordiale. Flemming, hématoxyline au fer. Mitochondries. D'après Meves.

Hypothèses sur la structure de l'hématie nucléée. — Les observations qui montrent des différenciations structurales dans les hématies des Batraciens, permettent d'émettre quelques hypothèses sur la structure de ces éléments. La substance du disque, très molle, est tendue sur un cercle élastique plus résistant, qui maintient sa forme ; voilà un fait certain. Le noyau, dont les liquides ou sucs nucléaires sont réduits dans l'hématie définitive, occupe le centre du disque. Dans l'espace situé entre le noyau et la bordure élastique se trouve probablement une charpente très réduite, dont l'existence nous est révélée surtout par l'effet des solutions acides sur les globules rouges de la grenouille, et par l'apparition de filaments autour du noyau (4). Ces différenciations structurales sont un reliquat du protoplasme de la cellule originelle. Entre les mailles de

(1) Meves, *Archiv f. mikr. An.*, LXXII, 1908.

(2) Meves, *Archiv f. mikr. An.*, LXXVII, 1911.— Shipley, *Folia hœmatologica*, XX, 1915.

(3) En mélangeant une goutte de sang avec une goutte du mélange suivant : solution d'acide iodique à 4 p. 100 contenant 1,5 p. 100 de NaCl : 20 centimètre cubes ; acide osmique à 2 p. 100 : 5 centimètres cubes, Meves a réussi à mettre en évidence dans les hématies, un réseau superficiel, distinct de la bandelette granuleuse, de la strie, des membranes transversales et des filaments mitochondriaux. Il n'est pas encore certain que ce réseau corresponde à une structure réelle préexistante. Cf. aussi Ruzicka, *An. Anzeiger*, 1903.

(4) Le fait que la substance du disque, à l'examen ultra-microscopique, paraît homogène, ne prouve absolument rien contre l'hypothèse d'une structure, la réfringence des portions différenciées étant noyée dans celle des substances qui l'entourent.

cet appareil se trouve la substance du disque, dans laquelle les différents constituants, y compris l'hémoglobine, se trouvent en combinaison physico-chimique. Existe-t-il enfin une membrane enveloppant le tout ? C'est là le point obscur et encore discuté. Ce qui a été décrit comme membrane par les anciens auteurs correspond en fait à la strie bordante. Depuis, l'existence de la membrane a été admise comme un postulat nécessaire pour expliquer les échanges osmotiques ; mais il suffit, en réalité, pour les expliquer, d'une membrane plasmatique. Comme membrane histologique véritable, on n'a en somme rien démontré jusqu'ici, et certains faits, comme les trous et les déchirures qui se produisent dans les solutions fortement hypertoniques sont même plutôt contraires à l'idée de son existence. Le problème n'est pas résolu (1).

Noyau de l'hématie. Corpuscules chromatiques paranucléaires. — Le noyau de l'hématie elliptique est petit par rapport à l'étendue du disque ; sa forme est ovalaire, parfois très allongée. Il peut être en forme de bissac ou étranglé en deux noyaux secondaires. Sur les préparations bien fixées et colorées, il paraît limité par une ligne très nette correspondant à la membrane ; le réseau chromatique est serré et très régulier ; les points nodaux sont disposés souvent en damier. Le suc nucléaire est peu abondant : on ne met jamais en évidence, dans ce noyau, un véritable nucléole.

Fig. 97. — Sang de Triton. Jeunes hématies contenant des corpuscules paranucléaires formés aux dépens du noyau. 700 diam.

Dans un certain nombre d'hématies elliptiques on peut colorer, dans le disque, un corpuscule sphérique assez volumineux qui prend les couleurs nucléaires. Ce corpuscule chromatique paraît homogène, il est ordinairement unique ; il peut être composé de plusieurs petites gouttelettes sphériques agminées. Ce corpuscule est facile à colorer. Il préexiste dans la cellule, il n'est pas artificiel, car il est visible dans le sang frais et apparaît, sans réactif, dans l'hématie, comme un petit globule réfringent. Les hématies portant un globule chromatique paraissent plus nombreuses dans les préparations de sang frais qui ont été conservées depuis quelque temps. Ces corpuscules sont distincts des granulations brillantes qu'on peut voir dans les globules rouges des larves de Batraciens et qui ont été considérés par *Ranvier* comme des grains vitellins. Par contre, ils paraissent analogues aux corpuscules paranucléaires décrits par *Bremer* dans le sang des tortues, et aux corpuscules décrits comme *centrosomes* par certains auteurs, en particulier par *Apathy* dans les globules rouges de salamandre. Il est peu vraisemblable qu'il s'agisse là de centrosomes. Il est beaucoup plus probable que ce sont là des particules chromatiques rejetées par le noyau. La formation de ces corpuscules chromatiques paranucléaires est facile à voir dans le sang du triton : un bourgeon nucléaire se sépare et subit la transformation pycnotique ; il constitue alors dans le discoplasma, un globule chromatique homogène. Les corps chromatiques paranucléaires semblent pouvoir se former aussi, pendant la division indirecte, par transformation d'un chromosome aberrant ; il s'agit souvent de mitoses anormales (2).

(1) Romieu (*S. de Biologie*, 14 janvier 1922) admet l'existence d'une membrane dans les globules rouges des Polychètes.

(2) Jolly, *C. R. de l'Ass. des An.*, V, Liége, 1903 et *Archives d'An. micr.*, VI, 1904.

Pendant la multiplication des globules rouges nucléés par mitose, chez l'embryon ou pendant la régénération du sang (voir ch. x et xviii) on peut mettre parfois en évidence aux extrémités du fuseau, un centrosome. Il se colore par l'hématoxyline au fer après la fixation du sang frais par les mélanges chromo-osmiques ou bichromate-formol. On peut le voir aussi sur les coupes des tissus hématopoiétiques. Dans les globules rouges nucléés au repos, les centrosomes sont très difficiles à voir. Par une méthode d'imprégnation au nitrate d'argent, *Golgi* a pu les colorer électivement (1).

Hématies des Poissons, des Reptiles et des Oiseaux. — Les faits que nous venons de décrire sur la structure de l'hématie s'appliquent aux autres globules rouges nucléés elliptiques. La strie bordante existe, plus ou moins développée, chez tous les Batraciens. Elle a été démontrée chez les Poissons ; elle existe aussi chez les Oiseaux et chez les Reptiles.

Variétés de cellules hémoglobiques chez les poïkilothermes. Jeunes hématies. Erythroblastes. — On peut observer encore, dans le sang des Vertébrés à globules rouges nucléés, d'autres cellules hémoglobiques. Les unes sont des cellules elliptiques discoïdes qui ont même aspect général que les globules rouges ordinaires, mais leur discoplasma est un peu moins teinté par l'hémoglobine ; son affinité pour l'orange est parfois moindre que pour l'éosine ou la fuchsine acide. Le noyau est ovalaire, mais plus gros, d'aspect vésiculeux ; le suc nucléaire est abondant, le réseau chromatique plus distinct. Ces cellules sont de *jeunes hématies* (2).

D'autres cellules ont un aspect très différent : elles sont sphériques, volumineuses, extrêmement pauvres en hémoglobine. Quand on les observe dans le sang frais, elles paraissent si peu teintées par le pigment respiratoire qu'un observateur non prévenu les confondrait facilement avec des leucocytes. Elles en sont cependant très distinctes : elles sont beaucoup moins réfringentes que les leucocytes ; leur protoplasma, homogène, apparaît parfois très légèrement teinté ; de plus, tandis que le noyau des leucocytes est très difficile à voir, le noyau des cellules que nous décrivons est facile à distinguer et il est très particulier. Il est sphérique, énorme, vésiculeux ; il occupe la plus grande partie de la cellule ; sa charpente chromatique formée de masses assez régulièrement disposées, apparaît distincte dans un suc nucléaire abondant. Ces cellules sont plus difficiles à bien fixer que les hématies ; elles sont altérées par la dessiccation et leur hémoglobine, très peu abondante, diffuse facilement. Après les colorations combinées, le cytoplasme prend en général une teinte intermédiaire à celle de la couleur acide et à celle de la couleur basique ; dans certaines, le cytoplasme se colore vivement par la couleur basique, pas du tout par la couleur acide et ne paraît pas contenir la moindre trace d'hémoglobine.

Ces cellules sont des *érythroblastes*, de futurs globules rouges et les hématies elliptiques proviennent de leur transformation. Elles sont assez rares dans le sang de la grenouille, plus fréquentes chez les Batraciens urodèles. On les observe

(1) Golgi, *Hæmatologica*, I, 1920. L'auteur les met aussi en évidence dans les hématies sans noyau des Mammifères.

(2) Voir chap. x et xviii.

assez facilement dans le sang des tritons et des lézards au printemps (1). Elles ressemblent aux hématies primordiales de l'embryon.

Hématies à noyau dégénéré. Hématies sans noyau. — D'autres variétés de cellules hémoglobiques peuvent être considérées comme des hématies vieillies et dégénérées. Le noyau devient homogène. La substance colorable semble s'être dissoute dans le suc nucléaire (*chromatolyse*). Ce noyau homogène et condensé est un noyau mort. Il peut être fragmenté en plusieurs fragments à contours anguleux, ou en petites gouttelettes colorées par les colorants nucléaires. L'ensemble de ces altérations est connu sous le nom de *pycnose* (condensation). Quelquefois, la fragmentation précède la chromatolyse; le noyau prend alors un aspect bourgeonnant. Dans certains cas, le bourgeonnement est partiel et le bourgeon se détache, subit la pycnose et se transforme en un globule chromatique paranucléaire décrit plus haut. Il est probable que parmi les hématies qui portent un corpuscule paranucléaire, beaucoup sont des cellules vieillies ou malades.

La cellule elle-même peut subir une fragmentation dégénérative : elle émet alors un gros fragment cytoplasmique contenant un corpuscule chromatique. Cette fragmentation peut aussi aboutir à la formation de fausses divisions directes. Le cytoplasme de ces cellules dégénérées présente parfois les caractères de la polychromatophilie.

Dans des cas plus rares, la dégénérescence nucléaire semble marcher assez vite; elle précède les modifications du cytoplasme. Aussi peut-on trouver, dans le sang des Batraciens, des Reptiles et des Poissons, des globules elliptiques, chargés d'hémoglobine, mais dans lesquels les méthodes de coloration ne montrent plus aucune trace de noyau. Ces hématies sans noyau ne sont pas absolument rares dans le sang des Batraciens (2). On peut considérer ce fait comme une ébauche d'un phénomène qui est généralisé à toutes les hématies chez les Mammifères.

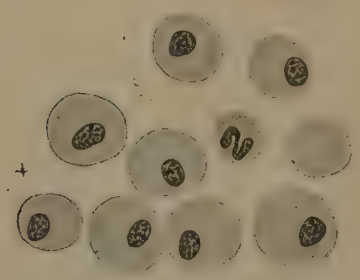


Fig. 98. — Sang de lamproie (*Petromyzon marinus*). Hématies nucléées, leucocyte à noyau polymorphe ; globule rouge sans noyau. 750 diam.

Hématies des Cyclostomes. — Parmi les vertébrés possédant des globules rouges nucléés, les Cyclostomes forment un groupe à part. Les lamproies (*Petromyzon marinus*, *P. fluviatilis*, *P. Flaveri*) ont en effet des hématies qui ont la forme de disques circulaires (3).

(1) Voir chap. XVIII.

(2) Jolly, *Archives d'An. micr.*, 1904, Les petits globules rouges sans noyau observés par Giglio-Tos (*An. Anzeiger*, XV, 1899) dans le sang d'un urodèle américain (*Batracho seps attenuatus*) sont considérés par cet auteur comme des fragments cellulaires.

(3) Les Myxinoïdes feraient exception et auraient des globules elliptiques, du moins d'après les anciennes observations de J. Müller. Parmi les Poissons osseux, certaines espèces qui ont été dans ces dernières années reconnues comme étant les formes larvaires de Murénides (*Leptocephalus*, *Tilurus*, etc.) n'ont dans le sang que des globules incolores et pas de globules rouges. D'autres de ces formes larvaires (*Helmichthys*,

Cellules fusiformes. — Le sang des Batraciens, des Poissons, des Reptiles et des Oiseaux contient encore, à l'état normal, des cellules particulières, non colorées par l'hémoglobine, plus petites que les hématies, mais qui par leur aspect et leur forme allongée, ont avec elles une certaine ressemblance : ce sont les *cellules fusiformes*. Ce sont là des éléments encore énigmatiques, auxquels on a fait jouer un rôle dans la rénovation du sang et dans la coagulation. Nous les étudierons plus loin (1).

Hématies chez les Invertébrés. — On trouve, chez un certain nombre d'Invertébrés, des cellules nucléées chargées d'un pigment qui paraît identique à l'hémoglobine (2). Ces hématies se voient chez les Echinodernes, dans le liquide cavitaire de plusieurs espèces d'holothuries (*Tochostoma*, *Cucumaria*, *Thyone*, etc.). Le fait est plus fréquent chez les Annélides. On trouve des hématies chez quelques espèces de Némertiens et surtout chez d'assez nombreux Polychètes (*Glycera*, *Goniada*, *Terebella*, *Polycirrus*, etc.). Ce sont de grands éléments nucléés arrondis et discoïdes qui atteignent parfois les dimensions des globules rouges de l'axolotl. On les trouve dans le liquide de la cavité générale. Le liquide cavitaire contient aussi des hématies chez les Géphyriens, chez tous les Sipunculides et chez quelques espèces d'Echiurides (*Phoronis*, *Thalassema*, *Hamingia*, *Sipunculus*, *Bonellia*, *Phascolosoma*, etc.). Chez quelques-uns de ces animaux, le pigment porté par ces cellules serait un peu différent de l'hémoglobine (3). Ces cellules sont souvent discoïdes comme chez les Glycères. Le noyau est ordinairement petit, parfois en pycnose. On observerait même, chez quelques espèces, des hématies sans noyau. Des globules rouges nucléés se rencontrent aussi dans le sang de quelques Mol lusques lamellibranches (*Arca*, *Pectunculus*, *Capsa*, *Tellina*, *Solen*) et amplusques hineures (*Neomenia*).

La distribution de ces hématies est ainsi extrêmement variée ; il est encore impossible de comprendre pourquoi elles apparaissent chez certaines espèces et pas chez d'autres et pourquoi certaines espèces en sont dépourvues alors que d'autres, très voisines, en possèdent.

Hyoprorus, etc.) auraient des globules rouges (voir Kölliker, *Zeitschrift f. wiss. Zoologie*, IV, 1853, et Ebner, *Köllike'rs Hand buch.*, 6e éd., 1902, III, p. 735). Il est vraisemblable que ces différences représentent simplement des états plus ou moins avancés du développement du sang. L'amphyoxus ne possède pas de globules rouges (voir chap. x et chap. xviii).

(1) Voir chap. viii et xviii.

(2) Cuénot, *Archives d'An. micr.*, I, 1897. *Archives de Zool. exp.*, X, 1892. — Foettinger, *Archives de biologie*, I, 1880. — Knoll, *Sitz. der K. Akad. d. Wiss. Wien.*, CII, 1893. — Kollmann, Th. sc. Paris, 1908. — Romieu, *C. R. Ac. de l'Ac, des sc.*, 2 novembre 1921 et *Soc. de Biologie*, 19 novembre 1921 et 14 janvier 1922.

(3) Hémérythrine.

CHAPITRE III

NOMBRE, DIAMÈTRE, VOLUME ET SURFACE DES HÉMATIES. MASSE TOTALE DU SANG

Lorsque le microscope fut appliqué à l'examen clinique du sang, on s'aperçut que dans les états anémiques, le sang, déjà plus pâle à l'œil nu, contenait souvent beaucoup moins de globules rouges. On chercha alors à évaluer méthodiquement ces modifications de nombre. Mais les premières méthodes employées ne furent pas des méthodes microscopiques. Elles consistaient essentiellement à évaluer le poids sec des globules dans un volume donné de sang. Plus tard, ces méthodes furent remplacées par la numération directe des hématies au microscope (1).

MÉTHODES DE NUMÉRATION

Les méthodes de numération directe consistent essentiellement dans les opérations suivantes :

1° Prendre un volume connu de sang;

2° Le diluer dans un volume connu d'un liquide n'altérant pas les globules, et de telle manière que les globules y soient également répartis;

3° Compter les globules contenus dans un volume connu de cette dilution (2).

(1) Toutes les méthodes de numération indirecte sont susceptibles de la même critique : lorsqu'elles déduisent le nombre des globules de leur proportion en poids ou en volume, de la richesse du sang en hémoglobine, de la quantité de fer, etc., elles supposent que ces volumes varient proportionnellement au nombre, ce qui n'est pas.

(2) C'est Vierordt qui, en 1852, évalua ainsi pour la première fois, le nombre des globules rouges. A l'aide d'un tube capillaire bien calibré, il aspirait un volume connu de sang, le déposait dans un volume connu d'eau gommée ou albumineuse. Ce mélange, de proportion connue, était repris par une pipette, et étendu en lignes droites sur un

Compte-globules de Malassez. — L'appareil de Malassez comprend : 1° une pipette-mélangeur; 2° une chambre humide graduée.

1° La pipette-mélangeur, ou mélangeur Potain, est une pipette bien calibrée dont le réservoir contient une petite bille de verre servant à brasser le mélange. La longue portion porte des divisions qui, du réservoir à la pointe, sont marquées 1, 2, 3, 4, 5. Exactement au-dessus du réservoir, un trait est marqué 101. La capacité du tube capillaire de la pointe jusqu'au trait 1 est la 100e partie de la capacité du réservoir. En aspirant du sang jusqu'à 1 et en continuant à aspirer du liquide de dilution de façon que le mélange se fasse dans le réservoir et que le liquide affleure le trait 101, on aura un mélange à 1 p. 100. On obtiendra de même des mélanges 1 p. 200, 1 p. 300, 1 p. 400, en aspirant du sang jusqu'aux traits 2, 3, 4. Le trait situé au-dessus du réservoir porte 101 et non 100 parce que le mélange ne pouvant se faire dans la longue portion de la pipette, c'est seulement la capacité du réservoir qui a été considérée, entre les traits 1 et 101.

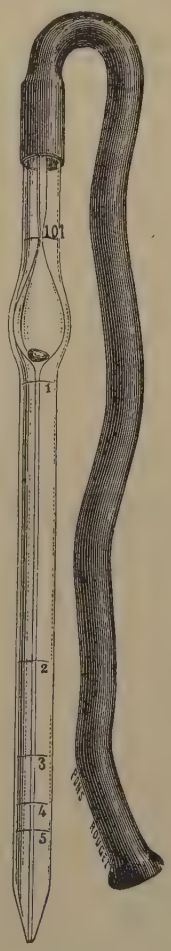


Fig. 99. — Mélangeur Potain.

2° La chambre humide graduée est une chambre humide à rigole circulaire, formée d'une lame métallique percée d'une ouverture dans laquelle a été encastré un disque de verre, qui forme le plancher de la chambre et joue le rôle de porte-objet. En dehors de la rainure, la lame est traversée complètement par trois vis, dont la saillie au-dessus de la surface de la lame peut être réglée à volonté. Cette saillie est calculée de telle sorte qu'il existe 1/5 de millimètre de distance entre la surface du plateau de verre et la face inférieure d'une lamelle plane et résistante qui reposera sur la tête de ces trois vis. Le liquide à examiner, déposé sur le plateau de verre, sera maintenu par capillarité entre le plateau et la lamelle; l'épaisseur de cette couche liquide est ainsi de 1/5 de millimètre. Pour éviter le déplacement du couvre-objet, l'appareil est muni d'un compresseur à ressort qui maintient la lamelle parfaitement appliquée contre les vis.

La profondeur de la chambre étant déterminée par la saillie des vis, la surface est donnée par un réseau gravé sur le plateau de verre. Les lignes du réseau s'entrecroisent à angle droit suivant deux directions et limitent des rectangles, eux-mêmes divisés en carrés plus petits. Les rectangles sont les champs de numération. Ce sont leurs dimensions qui doivent être retenues : 0,25 mm. de long et 0,20 mm. de largeur, ce qui donne une surface de 0 mm. q. 05. La chambre

porte-objet. On laissait sécher, et on comptait tous les globules au microscope à l'aide d'un micromètre constitué par une lamelle quadrillée couvre-objet. Mais le procédé, utilisé aussi par Welcker avec quelques variantes, était peu pratique, et très long. Ce sont les travaux de Cramer (1855), de Potain (1867), de Hayem et Nachet (1875) de Gowers (1877) mais surtout de Malassez (1872 et 1879) qui nous ont donné les méthodes simples et faciles que nous utilisons aujourd'hui.

étant profonde de 1/5 de millimètre, chaque champ de numération correspond donc à un volume de liquide de 1/100 de millimètre cube. Le réseau comprend 25 rectangles quadrillés, mais en totalité 100 rectangles. La surface divisée tout entière correspond à un volume de 1 millimètre cube. Ces dimensions simples ont été choisies pour faciliter les calculs.

Le liquide le plus recommandable pour la dilution du sang est celui de *Marcano* (1). Il est ainsi composé :

Solution de sulfate de soude D 1022	100 v.
Formol du commerce	1 —

Mode d'emploi de l'appareil. — Le sang est aspiré dans le mélangeur jusqu'au trait 4, 3, 2 ou 1, suivant le titre du mélange qu'on désire obtenir. Le mélange doit être d'autant plus étendu que le sang à analyser est plus riche en globules. Avec un sang contenant environ cinq millions de globules rouges, on fera des mélanges à 1 p. 400 ou à 1 p. 300. S'il s'agit du sang d'un homme anémique, on fera la dilution à 1 p. 200. Des mélanges plus concentrés seront réservés aux anémies extrêmes et à l'examen du sang des animaux qui ont très peu d'hématies. Des mélanges plus dilués (1 p. 500), seront employés dans l'étude du sang des animaux qui ont un nombre considérable de globules rouges (rat, chèvre, etc.). Lorsqu'on a aspiré le sang jusqu'au trait voulu, sans introduction de bulle d'air, on essuie avec soin la pointe de l'instrument.

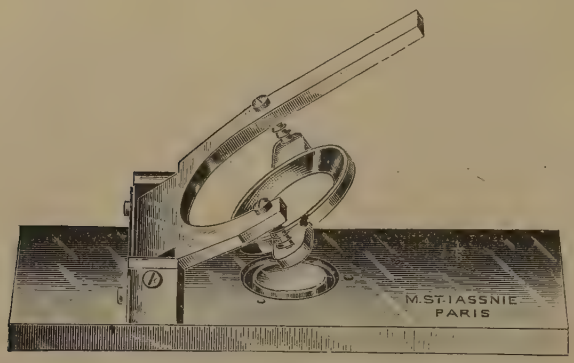


Fig. 100. — Compte-globules de Malassez. Chambre humide graduée munie d'un compresseur porte-lamelles.

Toutes ces opérations doivent être faites rapidement afin d'éviter la coagulation du sang. On aspire alors le liquide de dilution qui, précédé par la colonne sanguine, pénètre doucement dans le réservoir et le remplit peu à peu. La pointe du mélangeur doit plonger profondément dans le liquide ; il faut éviter d'aspirer de l'air. On arrête l'aspiration quand le mélange affleure au trait 101. On termine en agitant la pipette, afin que le mélange soit homogène : la main droite tenant le caoutchouc entre le pouce et l'index lui fait subir des mouvements de rotation alternatifs dans un sens et dans l'autre, la main gauche servant de support à la pointe.

(1) Marcano, *Archives de méd. exp.*, XI, 1899. On peut aussi employer une solution de chlorure de sodium à 1 p. 100 à laquelle on ajoute, en volume, 1 p. 100 de formol du commerce. Les solutions salines isotoniques, employées sans addition d'un fixateur, doivent être rejetées. Les liquides au sublimé (Pacini, Hayem) sont moins recommandables que les liquides au formol. On pourra aussi utiliser avec profit les solutions salées auxquelles on ajoute une petite quantité de solution iodo-iodurée (Hayem, *Soc. de Biologie*, 15 avril 1899).

On s'est assuré à l'avance que la lamelle étant placée sur les vis, et le compresseur rabattu, la lamelle repose bien d'aplomb sur les trois vis (1). Le mélange sanguin ayant été bien agité, on rejette d'abord les premières gouttes formées par du liquide de dilution presque pur. On dépose alors une grosse goutte du mélange sur le plateau porte-objet. On applique doucement la lamelle. On peut aussi préparer à l'avance le couvre-objet en mouillant légèrement le face inférieure du compresseur et y appliquant la lamelle qui tient alors par capillarité. Le compresseur est rabattu. La goutte déposée sur le porte-objet doit être assez large pour couvrir tout le plateau de la chambre et pénétrer même dans la rigole. La chambre humide est portée, bien horizontalement, sur la platine du microscope.

Fig. 101. — Manière d'aspirer le sang avec le mélangeur. Le caoutchouc est tenu dans la bouche.

Celle-ci doit être horizontale, ce qui aura pu être vérifié à l'avance. Certains compte-globules portent un petit niveau d'eau circulaire encastré dans la lame métallique. On obtiendra une précision plus grande en rectifiant la position du microscope avec un niveau ordinaire posé sur la platine.

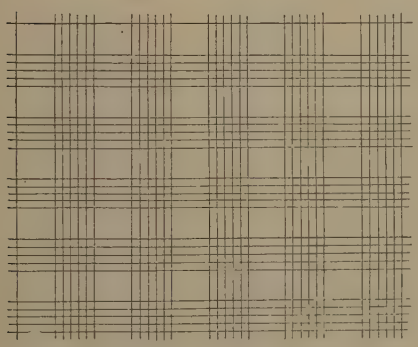


Fig. 102. — Ensemble du réseau dans le compte-globules de Malassez.

Le système optique a été choisi de telle sorte qu'un rectangle soit exactement inscrit dans le champ du microscope. Il est préférable de choisir un oculaire donnant un champ assez grand. Il importe que l'objectif ne vienne jamais au contact de la lamelle lors de la mise au point, et qu'à cette fin, il ait un foyer assez long.

La numération se fait uniquement dans les rectangles correspondant au 1/100 de millimètre cube. On comptera successivement les globules contenus dans les cinq rangées verticales en commençant par la gauche. On additionnera les cinq

(1) La lamelle doit être bien plane et d'une épaisseur suffisante. On ne peut employer les lamelles couvre-objets ordinaires.

chiffres obtenus. Pour tenir compte exactement des globules à cheval sur les lignes du réseau, on pourra procéder de la façon suivante : en comptant, on tiendra compte des globules touchant les lignes droite et inférieure de chaque petit carré. A la fin de la numération, se trouveront comptés de cette façon tous les globules contenus dans l'intérieur du rectangle et la moitié de ceux qui sont à cheval sur les lignes qui le limitent. Un globule qui touche une ligne du réseau appartient à cette ligne exactement comme s'il était à cheval sur elle.

Le calcul est simple : soit n, la somme trouvée pour un rectangle, tm, le titre du mélange, N, le nombre des globules dans 1 millimètre cube, on a : $N = n \times tm \times 100$. Supposons $n = 125$ et $tm = \frac{1}{400}$: $N = 125 \times 400 \times 100 = 5.000.000$. On prend la moyenne de plusieurs rectangles.

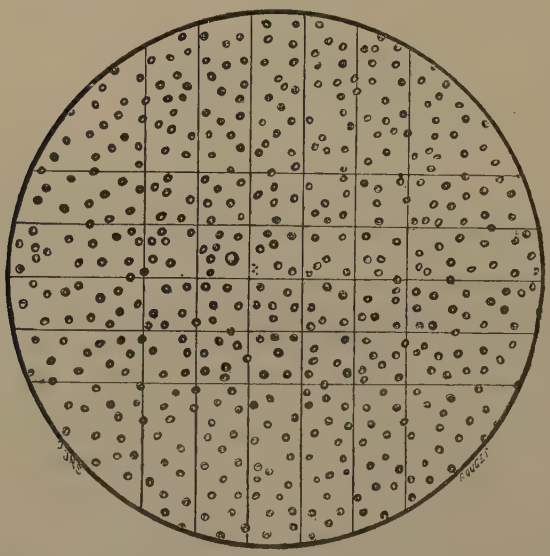


Fig. 103. — Aspect du mélange sanguin au microscope. Champ de numération.

Nettoyage des instruments. — Les instruments doivent être nettoyés avec soin après chaque numération. On vide le mélangeur et on le remplit à plusieurs reprises d'eau distillée. On y fait passer ensuite du liquide de Marcano. On pourra adapter au mélangeur une poire insufflatrice en caoutchouc qui permettra de dessécher rapidement l'instrument en y faisant passer un courant d'air. Cette précaution est particulièrement utile quand on fait des numérations successives. Les traces de liquide de dilution qui pourraient rester dans le réservoir ne sont toutefois la cause d'aucune erreur, à condition que la longue portion du tube capillaire soit absolument sèche. Pour chasser le liquide ou l'air du mélangeur, il vaut mieux adapter le tube de caoutchouc à la longue portion.

Si des dépôts se sont formés dans le mélangeur, on le nettoiera en faisant passer un acide ou de la lessive de potasse ; on rincera en faisant passer plusieurs fois de l'eau distillée ; on aspirera ensuite de l'alcool. On agira de la même manière pour détruire un caillot formé dans le tube capillaire pendant la prise de sang. On cherchera à l'aspirer dans le réservoir où on le détruira au contact prolongé de l'acide ou de la potasse. Il sera quelquefois nécessaire de plonger le mélangeur entièrement dans une solution de potasse et de porter lentement jusqu'à ébullition. La lamelle couvre-objet et le plateau du mélangeur seront lavés avec de l'eau distillée et essuyés avec un linge de toile fine.

Appareil de Hayem (1). — Avec l'appareil de Hayem, la dilution du sang est faite à l'air libre, dans une petite éprouvette, et non dans la pipette. Le mélange est observé dans une cuve de verre de profondeur connue. La surface examinée est déterminée par la projection d'un quadrillage sur le fond de la préparation.

Appareil de Thoma (2). — L'appareil de Thoma consiste essentiellement dans une chambre humide en verre, de profondeur connue, sur le fond de laquelle a été gravé un réseau de dimensions connues. On applique une lamelle bien plane. Le mélange est fait avec une pipette semblable au mélangeur Potain (3).

Vérification de l'appareil de Malassez. — Les erreurs dans la numération tiennent au degré d'exactitude des appareils, à la méthode elle-même et à son emploi. Le mélangeur sera vérifié à l'aide de pesées au mercure (4). Le mélangeur est lavé à l'acide, à l'eau distillée, à l'alcool-éther ; on le laisse sécher. L'appareil est pesé à la température du laboratoire dans une balance de précision. La tare étant faite, on remplit successivement la pipette de mercure jusqu'au trait 101, puis jusqu'à 1, jusqu'à 2, etc.; on obtient ainsi le poids de mercure de ces différents segments. Si la pipette est très inexactement graduée, il faut la rejeter. Si l'erreur ne porte que sur une division, on pourra la corriger et déplacer le trait.

La profondeur de la chambre humide sera vérifiée de la façon suivante : On applique sur la chambre humide, à la place du couvre-objet, une lame de verre de mêmes dimensions et parfaitement plane. On place les deux lames accolées, de champ, sur la platine du microscope. On mesure la distance qui sépare les deux lames en employant les procédés de mesure expérimentale du grossissement (voir plus loin).

Ce procédé exige quelques précautions : les deux lames doivent être parfaitement planes et exactement appliquées l'une sur l'autre. Leur position, par rapport à l'axe optique du microscope, doit être parfaitement perpendiculaire. Les bords doivent présenter des crêtes fines et doivent pouvoir être amenées au même plan afin qu'on puisse les voir en même temps. Ces différentes conditions ne peuvent

(1) Hayem et Nachet, *C. R. Ac. des Sc.*, 26 avril 1875. Hayem, *Du sang et de ses altérations anatomiques*, Paris 1889.

(2) Lyon et Thoma, *Virchow's Archiv*, LXXXIV, 1881.

(3) Le réseau et la graduation du mélangeur ont été modifiés suivant le but de la recherche. Avec l'appareil de Thoma, on fait un mélange spéciale pour les globules rouges et un mélange pour les leucocytes (voir chap. VII). La chambre de Thoma a été modifiée par Bürker ; la cellule comporte alors deux réseaux séparés par une rigole transversale. La chambre de Bürker a été munie récemment d'un compresseur imité de celui de Malassez. On a enfin imaginé plusieurs aspirateurs de précision. Nous ne pouvons ici insister sur ces modifications qui ne représentent pas toujours des perfectionnements. Nous insisterons seulement sur ce fait que les résultats donnés par les méthodes de numération n'ont de valeur que s'ils sont obtenus par le même opérateur, dans les mêmes conditions, avec le même type d'appareil et même, avec le même appareil. Les résultats obtenus de cette façon pourront, à la rigueur, varier, d'une façon absolue, d'un observateur à l'autre ; mais ils seront toujours comparables. Ce qu'il importe surtout de connaître, en effet, ce sont moins des chiffres absolus que le sens et la grandeur des variations.

(4) Les erreurs dues au manque d'adhésion du mercure sont moins considérables que celles qui sont causées par le faible poids spécifique de l'eau dans les pesées à l'eau.

guère être réalisées qu'avec des lames de verre. Le procédé suivant est plus facile :

On mesure la profondeur de la chambre au moyen de la vis micrométrique. La chambre humide est placée horizontalement sur la platine du microscope. On fait, sur le plateau porte-objet trois minuscule taches d'encre, une en regard de chaque vis. Sur la face inférieure de la lamelle couvre-objet, on fait trois taches semblables, placées de telle sorte que lorsque la lamelle sera mise en place, chaque tache de la lamelle recouvrira partiellement la tache correspondante du porte-objet.

On examine au microscope, successivement, le point d'entrecroisement des trois groupes de taches. On met au point sur le bord brillant de la tache supérieure, puis sur le bord de la tache inférieure. La profondeur de la chambre sera exprimée par le *déplacement angulaire de la vis micrométrique*. La plupart des constructeurs livrent aujourd'hui des microscopes portant une vis micrométrique dont le bouton est divisé avec repère permettant de mesurer les épaisseurs. La valeur des divisions est indiquée sur le cadran. L'opération ainsi faite suppose que le pas de la vis micrométrique est le même dans toute la longueur. On peut vérifier la hauteur et la régularité du pas de vis par empreinte et mesure directe. L'objectif employé doit être à foyer précis, à grand angle d'ouverture. La vérification ayant été faite pour chaque vis, on rectifie la hauteur de chaque vis de façon à obtenir en tous les points la profondeur de 200 μ.

La vérification du réseau est l'opération le plus simple. On vérifie d'abord, à un faible grossissement si le réseau est exactement tracé, s'il ne manque pas de lignes, si les lignes sont droites, sans ondulations, sans bavures ni éclatements. Puis, plaçant une goutte d'eau entre porte-objet et couvre-objet, on s'assure que les lignes sont bien visibles. Ensuite, on mesure l'écartement des lignes et surtout les dimensions des champs numération rectangulaires (1/5 et 1/4 de mm.). Cette opération suppose la connaissance de la mesure expérimentale du grossissement (voir plus loin). Un réseau inexact doit être rejeté ; il n'est pas susceptible de correction.

Erreurs dues à l'opérateur. — Les erreurs commises par un opérateur exercé peuvent se rapporter à la prise du sang et à la numération elle-même. Contrairement à ce que l'on croit souvent, les erreurs tenant au dénombrement, à la lecture, ne sont pas toujours les plus importantes (1). Celles qui sont dues à la confection du mélange sont tout aussi fréquentes, soit que l'affleurement de la colonne sanguine ou du mélange n'ait pas été exactement obtenu, — soit que le mélange n'ait pas été brassé assez longtemps et ne soit pas assez homogène. Il peut arriver que des traces de liquide soient restées dans la longue portion, ce qui donne un mélange trop dilué. Enfin, la pointe du mélangeur, lorsqu'on la plonge dans le liquide formolé, ne doit plus garder à sa surface aucune trace de sang.

Limite des erreurs dues à la méthode. — En admettant que les autres causes d'erreurs aient été éloignées, l'exactitude des résultats sera d'autant plus

(1) C'est pour les réduire encore qu'on a proposé de photographier le champ microscopique afin de conserver une image sur laquelle la numération peut être faite d'une manière absolument certaine. Mais c'est là un procédé peu pratique et qui ne peut s'appliquer qu'à des cas exceptionnels (Simon et Spillmann, *Réunion biologique de Nancy*, 13 décembre 1904).

grande que la numération aura porté sur un plus grand nombre de globules. L'expérience montre que les erreurs ne dépassent guère 2 à 3 p. 100 lorsqu'on numère au moins 500 globules dans le mélange, ce qui, avec l'appareil de Malassez, correspond, pour un sang de 5.000.000 de globules rouges, à la numération de 2 rectangles pour un mélange à 1 p. 200 et à 4 rectangles pour un mélange à 1 p. 400. Pour fixer les idées, pour un sang contenant 5.000.000 de globules, l'erreur possible est donc de 100.000. Il ne faut donc, dans les recherches cliniques et dans les recherches expérimentales faites sur le chien et le lapin, ne tenir compte que des différences supérieures à 100.000, en plus ou en moins (1).

NOMBRE DES HÉMATIES. VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES

Si l'on s'adresse à des individus appartenant à la même espèce animale, en prenant le sang dans les mêmes conditions, on constate que le chiffre des globules rouges est une valeur assez fixe, oscillant autour d'un chiffre d'équilibre, et dont les variations sont soumises à des conditions susceptibles d'être étudiées. Les variations du nombre des globules rouges dépendent en effet : de la région de l'arbre circulatoire où l'échantillon de sang a été prélevé, — de l'espèce animale considérée, — du sexe et de l'âge, — des différences individuelles entre sujets de même espèce, — des conditions physiologiques dans lesquelles se trouve le sujet.

Variations suivant les vaisseaux. — Le nombre des globules rouges varie suivant la région de l'arbre circulatoire où le sang a été prélevé, et le sens de ces variations est constant (2). Le sang artériel est partout identique à lui-même (3). Le sang des veines et des capillaires est, d'une manière générale, plus riche en hématies que le sang artériel, mais il existe des différences suivant les vaisseaux. Le sang des gros troncs veineux se rapproche du sang artériel, mais contient en général un peu plus de globules. Le sang des grosses veines

(1) Malassez, *Sur la numération des globules rouges du sang*. Thèse Paris, 1873. — Reinert, *Die Zählung der Blutkörperchen*, Leipsig, 1891. D'après les expériences et les calculs de Abbe et de Reinert, une erreur de 2 p. 100 correspond à la numération de 1.000 globules, une erreur de 3 p. 100 à la numération de 500, une erreur de 1 p. 100 à la numération de 4.000. Reinert donne, en comptant 1.200 globules, une erreur d'ensemble possible de 3 p. 100 comprenant environ 2 p. 100 pour le seul dénombrement. Voir aussi Lyon et Thoma, *Virchow's Archiv*, 1881, Bd. 84, p. 131. La formule de Abbe est : erreur probable $= \frac{0.674}{\sqrt{n}}$; n est le nombre des globules numérés.

(2) Ce fait a été bien montré par Malassez en 1873 (Thèse, Paris), dans des expériences faites surtout sur des chiens et des lapins. Bien qu'il ait été parfois mis en doute (Lesser, *Archiv f. Anatomie u. Phys. Phys. Abth.* 1878; Hayem, *Du sang;* Cohnstein et Zuntz, *Pflüger's Archiv*, XLII, 1888), on peut le considérer comme établi.

(3) On peut trouver une petite différence en plus pour les artérioles.

des membres contient plus de globules que le sang des artères. La différence est encore plus considérable pour le sang des veinules, qu'elles viennent de la peau, des muscles ou des glandes ; le sang des sinus veineux du crâne contient aussi plus de globules que le sang artériel.

Le sang des capillaires contient plus de globules que le sang des veines des membres. Le fait peut être constaté chez les animaux ; il a été observé plusieurs fois chez l'homme par *Malassez* en comparant le sang des capillaires du doigt au sang des veines superficielles du pli du coude.

Le sang veineux qui revient des reins, de l'intestin et de la rate est plus riche en globules que le sang de l'artère correspondante. Le sang veineux de l'intestin est moins riche que le sang des veines des membres ; les capillaires de l'intestin contiennent aussi moins de globules que les capillaires cutanés. D'une manière générale, le sang profond contient moins de globules que le sang périphérique.

Ces modifications ne sont pas dues à des néoformations de globules (1), mais à des actions mécaniques, circulatoires. Toutes les causes qui ralentissent le cours du sang produisent une augmentation de nombre des hématies. Le fait a été démontré expérimentalement par *Malassez* : le nombre des globules augmente dans les troncs veineux périphériques lorsqu'un obstacle se trouve en amont ; on réalise l'expérience en diminuant le calibre du vaisseau par une compression ; une vaso-dilatation produit au contraire en aval une diminution.

La section du sympathique cervical chez le lapin produit, du côté sectionné, dans le sang veineux de l'oreille, des différences par rapport au côté sain ; mais elles ne sont pas toujours dans le même sens (2). Il en est de même dans la veine crurale après la section du sciatique. C'est qu'il faut tenir compte ici, non seulement des modifications de calibre du vaisseau, mais des modifications qui peuvent survenir dans les échanges d'eau entre le plasma sanguin et les tissus (3).

(1) En mettant de côté pour le moment les résultats obtenus pour le sang veineux des organes hématopoiétiques (voir chap. XIV).

(2) MALASSEZ, Thèse Paris, 1873. — A. MAYER, *Soc. de Biologie*, 23 juillet 1904. — V. HENRI et J. JOLLY, *Soc. de Biologie*, 23 juillet 1904.

(3) Dans le sang veineux de la glande sous-maxillaire, chez le chien, MALASSEZ trouve plus de globules après la section de la corde du tympan ; le nombre des globules diminue par l'excitation du bout périphérique. MOUSSU et TISSOT (*Soc. de Biologie*, 12 décembre 1903), par l'excitation du nerf de la parotide chez le bœuf, provoquent, en même temps qu'un flux plus abondant de salive, une augmentation très nette du

Dans les recherches cliniques, chez l'homme, les différences qu'on peut obtenir suivant la région cutanée où le sang capillaire est recueilli (doigts, orteils, oreille, etc.) sont en général peu importantes. Mais elles peuvent être appréciables s'il existe des différences de température et de circulation. On trouve en général des chiffres plus forts dans les points ou la circulation est ralentie. Chez les hémiplégiques, on observe plus de globules dans le membre paralysé que dans le membre sain (1).

Variations suivant l'espèce animale. — Le nombre des globules rouges est assez fixe, pour une espèce considérée. Il varie notablement d'une espèce à l'autre (2).

Homme (à Paris, sang du doigt)	4.310.000
Homme (au bord de la mer)	4.526.000
Chien (veine fémorale)	5.550.000
Lapin (veine de l'oreille)	4.300.000
Cobaye (veine de l'oreille)	4.284.000
Pigeon (veine radio-cubitale)	2.950.000
Canard (*id.*)	2.300.000
Poule (crête)	2.605.000
Labrus bergilla (vieille de mer) (cœur)	1.960.000
Mugil cephalus (mulet) (cœur)	1.660.000
Anguilla muræna (cœur)	1.626.000
Lacerta agilis	1.375.000
Lacerta viridis	840.000
Tropidonotus natrix	730.000
Perca fluviatilis	950.000
Leuciscus dobula (chevaine)	860.000
Leuciscus rutilus (gardon)	840.000
Abramis brama (brème)	859.000
Rana fusca	371.000
Rana esculenta	250.000
Torpedo marmorata	65.500
Proteus anguineus	45.000

nombre des globules rouges dans le sang veineux parotidien. Dans ce cas, il faut invoquer la concentration du sang par suite de la sécrétion salivaire. Les grands abaissements de pression qui succèdent à la section de la moelle cervicale, produisent une diminution du nombre des globules rouges dans le sang, beaucoup d'hématies s'accumulant dans certains territoires capillaires (Cohnstein et Zuntz, *l. c.*).

(1) Sicard et Guillain, 5e *Congrès de Médecine interne*, Lille, 1899 ; Reinert, *l. c.* Cette hyperglobulie s'accompagne parfois d'une augmentation du nombre absolu des leucocytes.

(2) Voyez surtout Malassez, *Archives de Physiologie*, 1877. J'ai préféré donner les chiffres d'un même auteur qui sont bien comparables. Voir aussi sur cette question : Welcker, *Zeitschrift f. rat. Medicin*, XX, 1863, et Hayem, *Du sang*, Paris, 1889. Les chiffres du tableau expriment des moyennes et ne tiennent pas compte du sexe de l'individu.

D'une manière générale, le nombre s'abaisse, au fur et à mesure que l'on descend l'échelle des Vertébrés, comme le montre le tableau précédent, dont les chiffres sont empruntés aux travaux de *Malassez*.

Ce sont les Mammifères qui ont le plus de globules rouges. Les chiffres les plus élevés ont été trouvés chez les Ruminants, en particulier chez les Tylopodes (chameau et lama), et la chèvre (1), chez lesquels le nombre des globules rouges dépasse 10 millions. Certains rongeurs (rat, loir) ont aussi des chiffres très élevés. Parmi nos animaux du laboratoire, le chien a en général un nombre d'hématies supérieure à celui de l'homme (5 à 6 millions) ; chez le lapin et le cobaye, on trouve en général des chiffres voisins de ceux de l'homme, mais un peu plus faibles (4 millions), et chez le rat, des chiffres beaucoup plus forts (7 à 8 millions). Après les Mammifères, ce sont les Oiseaux qui ont le plus de globules ; chez eux, les chiffres trouvés oscillent entre 2 et 3 millions ; puis viennent, par ordre décroissant, les Téléostéens marins, les Reptiles, les Poissons osseux d'eau douce, les Batraciens anoures, les Sélaciens et les Urodèles.

D'une manière générale, dans la série animale, le nombre des globules rouges est d'autant plus grand que les échanges sont plus actifs ; le volume des hématies varie en raison inverse du nombre ; c'est chez les Batraciens urodèles qu'on trouve à la fois les globules les plus volumineux et les moins nombreux. Même chez les Mammifères, c'est dans les espèces dont les globules sont les plus petits qu'on trouve aussi les nombres les plus forts. La diminution de volume et l'augmentation de nombre multiplient les surfaces d'échange et doivent être considérées comme un perfectionnement.

Chez l'homme sain, les chiffres qui ont été donnés sont voisins de 5 millions ou un peu inférieurs (2). Le nombre de 4.500.000, donné par *Malassez*, correspond aussi à la moyenne de nos observations chez des citadins. On trouve généralement des chiffres un peu plus forts chez les individus vivant à la campagne ou au bord de la mer.

Variations individuelles. — On peut observer chez l'homme, dans

(1) Welcker trouve, chez le lama, 13.900.000 et chez un chevreau de huit jours, 9.720.000. — Hayem donne, chez la chèvre, 19.000.000, chez le chameau (*camelus bactrianus*) 10.930.000, chez le lama : 13.186.000. D'après les chiffres de Welcker, c'est parmi les mammifères, l'éléphant qui aurait les globules les moins nombreux (2.020.000).

(2) 5.264.500 (Vierordt) ; 4.576.000 (Welcker) ; 4.726.400 (Cramer) ; 4.418.000 (Malassez) ; 5.000.000 (Hayem) ; 4.998.780 (Otto) ; 4.974.000 (Laache), etc. Voir sur cette question : Malassez, *Exposé de titres*, Paris, Masson, 1894 ; Hayem, *l. c.* ; Reinert, *l. c.* Wilbouchewitch, *Archives de physiologie*, 1874 ; Dupérié, Thèse, Paris, 1878.

les mêmes conditions et à l'état de santé, des variations individuelles ; mais le plus souvent, elles sont en rapport avec le degré d'activité physique. Le sang des individus bien musclés contient en général un peu plus de globules.

Influence du sexe. — On trouve en général un peu moins de globules chez la femme que chez l'homme (1). Cette différence en faveur du sexe mâle existe aussi chez les animaux (2).

Influence de l'âge. — Le nombre des globules rouges augmente dans le sang au fur et à mesure du développement embryonnaire (3). Chez les mammifères dont l'évolution intra-utérine est rapide et courte, le nombre normal n'est pas toujours atteint au moment de la naissance. Chez l'homme, au moment de la naissance, le nombre définitif est atteint ; on trouve même en général, chez les nouveau-nés, des chiffres plus forts que chez l'adulte. Ces différences, qui tiennent surtout, comme nous le verrons, à l'aspiration du sang placentaire et à la perte d'eau que subit le nouveau-né pendant la première semaine, ne tardent pas à s'effacer (4). Les chiffres faibles qui ont été parfois rencontrés chez le vieillard tiennent probablement à des circonstances accessoires et au genre de vie (5).

Menstruation et grossesse. — La période menstruelle, chez la femme, fait diminuer légèrement le nombre des globules rouges ; cet abaissement, peu considérable, s'observe surtout lorsque les règles sont terminées (6). Au début, il peut y avoir même augmentation.

La grossesse produit le plus souvent une diminution de nombre, surtout apparente dans les derniers mois (7). A la suite de l'accouchement, on trouve toujours un abaissement marqué du nombre des hématies, dont l'importance est en rapport avec la perte de sang subie (8).

(1) Laache : 4.974.000 chez l'homme et 4.430.000 chez la femme. — Otto : 4.998.780 chez l'homme et 4.584.700 chez la femme. — Marcano : 4.535.999 chez l'homme et 4.179.066 chez la femme (voir Marcano, *Journal de Physiologie et de Path. gén.*, 1901, p. 167).

(2) Par exemple, chez le lapin mâle : 4.540.000, chez la lapine : 4.160.000 ; chez le coq : 2.826.000 ; chez la poule : 2.400.000 (Malassez, *Archives de Physiologie*, 1877).

(3) Voir chap. XI.

(4) Schiff, *Zeitschrift f. Heilkunde*, XI, 1890. Voir aussi chap. XI.

(5) Voir Schmaltz, *Deutsches Archiv. f. klin. Medicin*, XLVI, 1890.

(6) Malassez, *Soc. de Biologie*, 31 octobre 1874, et *Exposé de titres*, p. 20. — Hayem, *Du sang*, 1889, p. 193.

(7) Bidone et Gardini, *Archives italiennes de biologie*, 1899. — Sfameni, *Archives italiennes de biologie*, 1899.

(8) La diminution de la capacité vasculaire, par suite de l'involution utérine, après la délivrance, lutte contre cet abaissement.

Influence des conditions de vie, des saisons. — Pour un même individu, et dans les mêmes conditions, le nombre des globules rouges est assez fixe. Il subit des variations avec les changements intervenus dans les conditions physiologiques. La sudation, la diurèse, l'ingestion d'aliments solides produisent des augmentations légères et passagères par concentration du sang. A côté de ces augmentations apparentes, il en est d'autres qui sont réelles et plus durables comme celles qui sont dans la dépendance d'une alimentation riche, de la vie au grand air, de l'exercice. D'une manière générale, le nombre des globules rouges augmente chaque fois que l'organisme accélère ses combustions et a besoin de plus d'oxygène. C'est ainsi que le nombre de globules rouges est en général plus élevé l'hiver que l'été ; pour maintenir le corps à une température constante, il faut plus d'oxygène pendant la saison froide.

Alimentation. — L'ingestion abondante d'eau produit une diminution légère des globules, qui n'est pas constante (1). L'ingestion d'aliments solides produit des effets variables. Certains auteurs ont trouvé une diminution (2), d'autres ont observé une augmentation (3). *Marcano* (4) sur des lapins, trouve une augmentation constante des globules que l'on peut observer déjà 5 minutes après le repas et qui est très passagère. Elle semble due à une concentration du sang en globules par perte de plasma.

Inanition. — L'inanition complète produit en général au début une augmentation progressive du nombre des globules rouges due probablement à la concentration du sang ; si l'expérience est prolongée, cette augmentation est suivie, un peu avant la mort, d'une diminution (5). Cette diminution tardive, qui correspond à une véritable anémie, s'observe aussi lorsque le jeûne a été interrompu ; elle peut persister après que le corps a retrouvé son poids primitif. Dans l'inanition incomplète, on peut observer une diminution. Nous dis-

(1) Dans le sang des noyés, le nombre des globules rouges est très diminué ; l'eau a été absorbée, non seulement par le tube digestif, mais aussi par les poumons, et en quantité parfois considérable (voir Brouardel et Vibert, *Annales d'hygiène publique et de médecine légale*, 1880 ; Brouardel et Loye, *Archives de physiologie*, 1889).

(2) Malassez, *C. R. de la Soc. de Biologie*, 27 mai 1876. — Vierordt, *Archiv f. phys. Heilkunde*, XI, 1852. — Limbeck, *Grundriss einer klinischen Pathologie des Blutes*, 2e Auflage, 1896, p. 219.

(3) Wilbouchewitch, *Archives de physiologie*, 1874.

(4) Marcano, *J. de physiol. et de pathol. gén.*, 1899.

(5) Malassez, *Soc. de Biologie*, 27 juin 1874, *Archives de physiologie*, 1875, et *Exposé de titres*, 1894. — Hayem, *Du sang*, p. 189.

cuterons plus tard la question de savoir dans quelle mesure une alimentation insuffisante est capable de produire l'anémie (voir ch. XVI).

La privation d'eau a les mêmes effets que l'inanition complète au début : elle produit une augmentation de globules par concentration du sang. On produit les mêmes effets par la dessiccation ; l'expérience est facile à réaliser avec des grenouilles placées en vase clos.

Régimes. — L'influence des régimes est moins bien connue. Les diminutions qui ont été observées chez les animaux dont le régime était complètement modifié peuvent être expliquées par des phénomènes accessoires. La ration insuffisante en albuminoïdes chez les carnivores ne provoque pas nécessairement une anémie (voir chap. XVI). Ce qui est bien démontré par contre, c'est la nécessité du fer. Un régime pauvre en fer, comme le régime lacté exclusif, surtout chez les sujets jeunes, en voie de croissance, et dont les tissus réparateurs réagissent mal, peut provoquer des diminutions globulaires et de véritables anémies, qui du reste, portent plus encore sur la diminution de l'hémoglobine que sur la diminution du nombre des hématies (voir chap. XVI). Chez les animaux très engraissés, on peut observer un léger abaissement du nombre des globules qu'on a vu parfois aussi chez les individus obèses.

Hibernation. — L'hibernation peut produire une diminution du nombre des globules rouges. Le fait a été observé chez la marmotte à la fin de la période de torpeur. Pendant la première partie de la période de sommeil, on observe au contraire une concentration globulaire et une augmentation du nombre des hématies (1).

Pertes d'eau. — Les pertes d'eau ont les mêmes effets que la privation d'eau : elles concentrent le sang et produisent une augmentation globulaire (2). Ces pertes d'eau peuvent être provoquées par une diurèse exagérée, des sueurs abondantes, une évaporation pulmonaire plus active à la suite des exercices physiques, ou de l'élévation de la température extérieure, la diarrhée, l'adminis-

(1) VIERORDT, *Archiv f. phys. Heilkunde*, 1852. — R. DUBOIS, *Physiologie comparée de la marmotte*, Paris, 1896.

(2) L'hyperglobulie de l'effort, des exercices physiques, n'est pas due seulement à la concentration par sudation, mais aussi au nombre plus grand des hématies qui circulent.

tration d'un purgatif. L'œdème, l'ascite, produisent les mêmes effets que la diurèse : le sang se concentre en globules (1).

Injections intraveineuses. — Les injections intraveineuses de solutions salines isotoniques produisent une diminution globulaire par dilution du sang. Les injections hypodermiques produisent le même effet (2). Le phénomène est apparent aussitôt, mais il ne dure pas et l'équilibre normal est rétabli très rapidement, en une demi-heure, en une heure. Dans ces expériences, l'effet produit n'est pas proportionnel à la quantité d'eau introduite ; il faut faire intervenir aussi d'autres facteurs, l'appel d'eau des tissus et la fonction rénale. Ce sont des faits que nous examinerons plus en détail au chapitre XVIII.

Transfusion. — A la suite de la transfusion d'une certaine quantité de sang chez un animal sain de même espèce, on trouve une augmentation du nombre des hématies, dont l'importance est en rapport avec la quantité de sang injectée (3). Le plasma injecté en excès est en effet rapidement éliminé, tandis que les globules disparaissent lentement. L'hyperglobulie ne dure pas ; l'équilibre normal est rétabli en quelques jours.

Température. Lumière. — Les modifications qui ont été observées chez l'homme par les changements survenus dans la température extérieure sont peu importantes et passagères et dues surtout à une perte d'eau à la fois par la peau et par le poumon (transpiration, bains chauds, bains de vapeurs, etc.) ou à une distribution inégale en rapport avec des actions vaso-motrices (froid, bains froids, etc.). Ces actions peuvent être beaucoup plus considérables lorsqu'on fait les expériences chez les animaux, avec des modifications de température plus intenses et plus prolongées, pouvant conduire à la mort par hyperthermie ou par réfrigération. Dans ces cas, il peut se produire une destruction d'un certain nombre de globules et de l'hémoglobinurie (voir ch. XVI).

La saison froide, chez l'individu normal, augmente légèrement le

(1) MALASSEZ, *Soc. de Biologie*, 1874, *Exposé de titres*, p. 18. — BROUARDEL, *Soc. méd. des Hôpitaux*, 14 juillet 1876. — HAYEM, *Du sang*, p. 192. — GRAWITZ, *Klinische Pathologie des Blutes*, 4e éd., Leipsig, 1911, p. 101 ; *Deutsches Archiv f. klin. Medicin*, XCI, 1907. — GILBERT et GARNIER, *Soc. de Biologie*, 29 janvier 1898. — QUISERNE, Thèse méd., Paris, 1902.

(2) MARCANO, *J. de phys. et de path. gén.*, septembre 1899.
COHNSTEIN et ZUNTZ, *Pflüger's Archiv f. die ges. Phys.*, XLII, 1888.

(3) Voir chap. XVI.

nombre des globules rouges ; il s'agit là d'une augmentation vraie, en rapport avec l'augmentation d'intensité des échanges. Il n'est pas démontré encore que le climat tropical, à lui seul, produise des diminutions globulaires importantes ; les résultats sont, à ce sujet, assez contradictoires ; l'anémie des tropiques est avant tout le résultat de la présence de parasites spéciaux dans le sang. La lumière semble avoir peu d'influence (voir ch. XVI).

Influence de l'altitude et de la raréfaction de l'air. Hyperglobulie des altitudes. — En 1890, *Viault* (1), examinant le sang d'individus vivant sur les hauts plateaux de l'Amérique du Sud, à 4.000 m. d'altitude, y trouva des nombres très élevés de globules rouges (7 à 8 millions). Il constata le même fait sur lui-même dans une ascension au Pic du Midi et l'observa également chez quelques-uns des animaux qu'il avait emportés (2). Ce fait, qu'il interpréta aussitôt comme une adaptation de l'organisme aux basses pressions, fut retrouvé par divers auteurs (3) et pour des altitudes souvent peu considérables. Dans les expériences faites avec des animaux, examinés successivement dans la plaine et en montagne, la teneur en hémoglobine du sang s'élevait aussi (4). Puisque ces phénomènes représentaient une adaptation à la dépression barométrique, on pouvait essayer de les reproduire au laboratoire en maintenant des animaux dans de l'air raréfié ; différents auteurs purent ainsi reproduire, expérimentalement, chez l'animal, une hyperglobulie en rapport avec la faible tension du milieu en oxygène (5).

La plupart des observateurs avaient signalé, dans leurs expériences, la rapidité avec laquelle le phénomène apparaissait et disparaissait ensuite, dans la plaine ; d'où l'idée de le reproduire par des ascensions brusques, en ballon. Mais la plupart des expériences faites dans ces conditions furent négatives, ou bien les augmentations constatées furent inconstantes ou faibles (6). Ces expériences en ballon fu-

(1) VIAULT, *C. R. Ac. des sciences*, 15 décembre 1890 et 2 février 1891.

(2) VIAULT, *C. R. Ac. des sciences*, 27 juin 1892.

(3) MERCIER, *Archives de physiologie*, 1894. — EGGER, KARCHER, MIESCHER, SUTER et VEILLON, *Archiv f. exp. Path. und Pharmakol.*, XXXIX, 1897. — JAQUET, *Archiv f. exp. Path.*, 1901. — QUISERNE, Thèse Paris, 1902.

(4) MÜNTZ, *C. R. Ac. des sciences*, 2 février 1891.

(5) SELLIER, Thèse de Bordeaux, 1895. — REGNARD, *Soc. de Biologie*, 28 mai 1892. Inversement, l'augmentation de tension de l'oxygène provoquerait la diminution du nombre des globules rouges (DOYON et MOREL *in Traité de Physiologie de Doyon et Morat*, Paris, 1904, I, p. 585).

(6) BENSAUDE, *Soc. de Biologie*, 14 décembre 1901. — CALUGAREANU et V. HENRI, *Soc. de Biologie*, 30 novembre 1901. — J. JOLLY, *Soc. de Biologie*, 30 novembre 1901. — V. HENRI et J. JOLLY, *Soc. de Biologie*, 23 juillet 1904. — LAPICQUE, *Soc. de Biologie*, 23 juillet 1904. — A. MAYER, *Soc. de biologie*, 23 juillet 1904.

rent le point de départ de nouvelles recherches; les résultats obtenus par les premiers auteurs furent remis en question. On refit des expériences en montagne (1) ou au laboratoire dans des caisses à dépression (2), et on obtint des résultats inconstants. Les hyperglobulies signalées par les premiers auteurs ne concernaient que le sang périphérique; on étudia comparativement le sang périphérique et le sang central (cœur, artère fémorale, etc.); ce dernier fut trouvé toujours moins riche en globules rouges, comme c'est la règle chez l'animal normal; lorsqu'il se produisait une augmentation, elle ne concernait que le sang périphérique (3).

Il semble donc que les augmentations de globules rouges signalées à la suite des ascensions en montagne ou en ballon représentent un phénomène inconstant et faible, sans rapport direct avec le degré de l'altitude. Il est peu probable que ce phénomène, lorsqu'il existe, soit le résultat d'une néoformation. Les globules rouges nucléés, dont certains auteurs avaient signalé l'apparition, n'ont pas été retrouvés (4). Il est beaucoup plus probable qu'il s'agit là de phénomènes de répartition inégale, sous l'influence d'actions vaso-motrices, causées par le froid ou par d'autres facteurs (5). Les hyperglobulies légères et inconstantes des ascensions ne sauraient donc avoir la valeur d'un phénomène d'adaptation de l'organisme.

Existe-t-il cependant une hyperglobulie de l'altitude en rapport avec l'acclimatement lent de l'homme ou des animaux à la dépression des climats élevés? Certaines expériences paraissent positives (6). Il est tout naturel que des animaux et des hommes, venant de l'air confiné du laboratoire et de la ville et transportés dans un milieu aéré et plus froid, faisant un exercice physique modéré et mangeant davantage, subissent des augmentations globulaires réelles, du même ordre que celles que subit le citadin qui est transporté à la campagne ou au bord de la mer. Il est fort possible aussi que la dépression ba-

(1) Armand Delille et A. Mayer, *Journal de physiologie*, 1904. — Foa, *Archives italiennes de Biologie*, 1903 et 1904. — Guillemard et Moog, *J. de physiologie*, IX, 1907.

(2) Ambard et Beaujard, *Soc. de Biologie*, 3 mai 1902. — Sellier, *Th. Bordeaux*, 1895.

(3) V. Henri et J. Jolly, *Soc. de Biologie*, 23 juillet 1904. — Jolly, *l'Aéorophile*, 7 juin 1905. — Armand Delille et A. Mayer, *J. de physiologie*, 1904.

(4) Jolly, *Soc. de Biologie*, 30 novembre 1901. L'apparition de microcytes et de poïkilocytes en grand nombre signalée par un certain nombre d'auteurs, est un fait qui reste également douteux et exige confirmation. L'examen histologique des organes hémopoiétiques n'a montré à A. Mayer et Armand Delille (*l. c.*) aucun signe de néoformation.

(5) Lapicque, *Soc. de Biologie*, 23 juillet 1904, et *Exposé de titres*. — Jolly, 1905, *l. c.* — Becker, *Deutsches Archiv f. klin. medicin*, LXX, 1901. — Soubies, Th. Paris, 1907.

(6) Armand Delille et A. Mayer, *l. c.*

Guillemard et Moog, *C. R. Académie des sciences*, 1906; *J. de phys. et de path. gén.*, 1906 et 1907.

rométrique s'ajoute à ces causes pour exciter la néoformation sanguine. C'est là un point qui demande encore des éclaircissements.

Il semble que les animaux et les individus nés à une altitude élevée ou qui y séjournent depuis longtemps aient réellement un plus grand nombre de globules, une quantité d'hémoglobine plus grande ; la capacité respiratoire de leur sang périphérique est accrue. Pour les sujets qui ont été transportés depuis peu, l'augmentation rapide des globules et de l'hémoglobine est inconstante et elle concerne surtout les jeunes animaux. Il est probable qu'à la suite d'un court séjour, l'augmentation est légère et apparente et qu'à la suite d'un séjour plus prolongé, l'augmentation devient réelle et totale (1) ; mais elle n'a pas l'importance ni la rapidité qui lui ont été souvent attribuées (2). Une hyperglobulie analogue a été parfois signalée chez les aviateurs.

Modifications pathologiques du nombre des hématies. Polyglobulies. — Lorsque l'organisme subit une perte d'eau, le sang se concentre en globules, d'où des augmentations apparentes qui tiennent simplement aux modifications survenues dans le rapport du plasma aux globules.

Cette concentration globulaire explique les hyperglobulies ou polyglobulies observées chez les nouveau-nés, celles qui suivent une diurèse exagérée, des sueurs profuses et surtout la diarrhée. Elle explique de la même façon les chiffres forts d'hématies que l'on trouve dans les maladies qui s'accompagnent d'œdème. Dans les maladies du cœur mal compensées, la concentration du sang peut masquer l'anémie. Au moment du rétablissement de la circulation normale et de l'amélioration des symptômes asystoliques, la concentration diminuant, le chiffre des globules peut subir un abaissement. Cette concentration du sang s'observe aussi dans la néphrite chronique avec œdème ; mais ici, l'atteinte générale portée à l'organisme produit souvent une hypoglobuline que la concentration du sang ne réussit pas à masquer, sauf quelquefois, après les crises de polyurie. Quant aux augmentations vraies des globules rouges qu'on observe à la suite du traitement des anémies par la vie au grand air, le séjour au bord de la mer ou en montagne, l'administration du fer, l'admi-

(1) Dastre, Rapport de la Commission d'aérostation du 29 juin 1908, *in C. R. de la Soc. de biologie*, 1919.

(2) D'après les recherches de Tissot, dans les ascensions à hautes altitudes, jusqu'à 5.000 mètres, la consommation d'oxygène reste invariable ; puis, jusqu'à 9.000 mètres, la consommation d'oxygène augmente avec l'altitude ; au delà, elle tombe rapidement et produit l'asphyxie.

nistration du mercure chez les syphilitiques, elles doivent être considérées plutôt comme un retour à l'état normal.

A côté des polyglobulies fausses, dues à la concentration, il existe un certain nombre de faits, dont la connaissance est de date récente, et qui concernent des augmentations véritables, durables, très importantes, qui accompagnent divers états pathologiques. C'est à cet ensemble de faits qu'il convient de réserver le terme de *polyglobulies*.

Polyglobulie de la cyanose congénitale. — La cyanose congénitale due à une malformation cardiaque (rétrécissement de l'artère pulmonaire compliqué ou non de perforation interventriculaire et de persistance du canal artériel) s'accompagne d'une augmentation durable, chronique, du nombre des globules rouges dans le sang. Cette polyglobulie, qui atteint en général 6 à 8 millions, peut manquer ou être très légère ; elle peut aussi présenter des intermittences. Signalée par *Krehl* en 1889, elle a été surtout étudiée par *Vaquez* (1), *P. Marie* (2) et *Widal* (3). Elle s'accompagne d'une augmentation très nette et constante du diamètre moyen des hématies (4) ; l'hémoglobine est aussi augmentée, mais pas toujours dans les mêmes proportions, d'où une diminution de la valeur globulaire (voir ch. IV). Elle ne s'accompagne généralement pas de polynucléose ni d'apparition de globules rouges nucléés (5) et l'hyperplasie des tissus hémopoiétiques est moindre que dans l'érythrémie (6). Il s'agit cependant bien d'une polyglobulie vraie, qu'il est possible de constater dans le sang artériel et veineux, comme dans le sang des capillaires périphériques, et qu'on peut considérer comme un phénomène d'adaptation.

Polyglobulie de la cyanose par obstacle respiratoire. — On a parfois observé un certain degré de polyglobulie dans les cas où il existe un obstacle à l'arrivée de l'air dans le poumon, chez des malades atteints d'emphysème ou de sclérose pulmonaire. Des faits analogues ont pu être provoqués, par des expériences, en rétrécissant la trachée ou en supprimant la fonction d'un poumon. La cyanose des affections cardiaques non congénitales (symphise cardiaque) peut

(1) Vaquez, *Soc. de Biologie*, 7 mai 1892 et 2 mars 1895 ; *Soc. méd. des hôpitaux*, 25 janvier 1895.

(2) P. Marie, *Soc. méd. des hôpitaux*, 11 janvier 1895.

(3) Cf. aussi Quiserne, Thèse méd., Paris, 1902.

(4) Vaquez, *Soc. de Biologie*, 2 mars 1895.

(5) Aubertin, *les Polyglobulies*, *in* Gilbert et Weinberg, *Du sang*, I, p. 211 et *Archives des maladies du cœur*, VI, 1913.

(6) E. Weil, *S. de Biologie*, 29 juin 1901.

provoquer une polyglobulie analogue à celle de la cyanose chronique, ayant les mêmes caractères, mais moins marqués (1).

Polyglobulies réactionnelles. — A la suite de certaines intoxications par des toxiques généraux (arsenic, phosphore, etc.) ou par des poisons hémolysants, on a parfois noté une polyglobulie passagère qui peut être considérée comme une réaction, comme le résultat d'un effort réparateur exagéré et momentané. Cette hyperglobulie réactionnelle a été observée avec le benzène (2) et surtout avec le cyclohexane (3). Il s'agit bien d'une polyglobulie vraie, qui a été constatée dans le sang profond, comme dans le sang périphérique.

C'est à une réaction passagère et intense des tissus hémopoiétiques qu'il faut attribuer aussi les polyglobulies causées par l'injection du sérum d'un animal saigné (4) ou par l'injection d'extraits de moelle osseuse. Ces faits rentrent dans la catégorie de ceux qui concernent l'action des agents thérapeutiques sur la réparation. Une polyglobulie réactionnelle a été constatée dans certaines affections de la rate, en particulier dans la splénomégalie tuberculeuse primitive (5).

Polyglobulie essentielle (6). — A côté des polyglobulies réactionnelles, dues à un effort plus intense des tissus hémopoiétiques souvent causé par une gêne chronique de l'hématose, il faut placer une polyglobulie acquise et chronique qui apparaît comme l'expression d'une maladie spéciale et a été bien distinguée par *Vaquez* des polyglobulies des autres cyanoses (7). Elle débute dans l'âge adulte et entraîne invariablement la mort en quelques années. Comme certaines leucémies avec lesquelles cette maladie a plus d'un trait de ressem-

(1) Parkes Weber, *Archives des maladies du cœur*, VI, 1913.

(2) Selling, *Ziegler's Beiträge*, LI, 1911; — Langlois et Desbouis, *J. de Phys. et de Path. gén.*, IX, 1907.

(3) Launoy et Levy-Bruhl, *Soc. de Biologie*, 28 février 1920 et *Soc. de Chimie biologique*, juin 1920. Cette polyglobulie s'accompagne de l'apparition de normoblastes dans le sang. Elle paraît due à la fois à un phénomène réparateur à la suite d'une action hémolytique et à une excitation directe des centres formateurs de globules rouges.

(4) Carnot et Deflandre, *C. R. Ac. des sc.*, 27 août et 17 septembre 1906. — Carnot, *Soc. de Biologie*, 3 novembre 1906.

(5) Rendu et Widal, *Soc. méd. des hôpitaux*, 2 juin 1899. — Vaquez et Widal, *Soc. méd. des hôpitaux*, 16 juin 1899. — Lefas, Thèse Paris, 1903. — Moutard-Martin et Lefas, *Soc. méd. des Hôpitaux*, 9 juin 1899.

(6) Maladie de Vaquez, érythrémie — le terme d'érythrocytose étant appliqué quelquefois aux polyglobulies réactionnelles.

(7) Vaquez, *Soc. de Biologie*, 7 mai 1892, et *Soc. méd. des hôpitaux*, 25 janvier 1895. — Osler, *Am. Journal of the med. Science*, août 1903, *Brit. med. Journal*, 16 janvier 1904 ; — Türk, *Wiener klin. Woch.*, 11 et 18 février 1904 ; — Vaquez et Laubry, *Soc. méd. des Hôp.*, 22 juillet 1904; — Cheinisse, *Semaine médicale*, 29 août 1906; — Parkes Weber, *Lancet*, 24 novembre 1906; — Glässner, *Wiener klin. Woch.*, 6 décembre 1906.

blance, elle s'accompagne d'une augmentation de volume de la rate et les hémorragies diverses y sont fréquentes. Le sang contient 7 à 10 millions de globules rouges. Ces chiffres énormes, qui peuvent être dépassés, ont été retrouvés dans le sang veineux et dans le sang artériel dans les cas rares où cette constatation a pu être faite. La polyglobulie est permanente et progressive avec des rémissions. L'hémoglobine augmente parallèlement ; la valeur globulaire n'est pas modifiée. Le diamètre des hématies est normal, contrairement à ce qu'on voit dans la cyanose chronique congénitale dans laquelle il est augmenté (1). On a généralement trouvé un chiffre élevé de leucocytes avec polynucléose et parfois apparition de myélocytes. On peut observer des globules rouges nucléés, mais ils sont en petit nombre. Le volume total du sang est augmenté notablement, comme le montrent les mensurations de la masse totale et aussi la structure angiomateuse des tissus et des viscères, constatée aux autopsies.

La nature de cette maladie n'est pas encore connue. Les premiers auteurs qui l'ont étudiée ont vu seulement en elle le résultat d'une suractivité des organes hématopoiétiques. Les cas dans lesquels à la polyglobulie s'ajoutait l'apparition de myélocytes en nombre plus ou moins grand, ont permis de supposer qu'ici, comme dans les leucémies, les modifications du sang reposaient sur des modifications profondes des tissus hématopoiétiques, à marche progressive, rappelant celle des néoplasmes (2).

Diminution du nombre des hématies dans les états pathologiques. — La diminution du nombre des hématies, appelée parfois hypoglobulie, se voit à la suite des hémorragies, dans l'inanition prolongée et dans un très grand nombre d'états pathologiques où elle constitue le signe microscopique le plus frappant de l'anémie (voir ch. XVI). Toutefois, la diminution du nombre des globules rouges ne peut suffire à elle seule, à caractériser le degré de l'anémie ; il faut y ajouter la connaissance de la quantité d'hémoglobine totale et surtout de la quantité d'hémoglobine contenue dans chaque globule rouge (voir ch. IV).

DIMENSIONS DES HÉMATIES. ÉVALUATION DU DIAMÈTRE

L'examen superficiel de préparations de sang provenant d'animaux différents montre immédiatement combien les dimensions de

(1) VAQUEZ, *Soc. de Biologie*, 16 juillet 1904.

(2) E. WEIL, *Soc. de Biologie*, 29 juin 1901. — MÉNÉTRIER et AUBERTIN, *Leucémie myéloïde*. — BLUMENTHAL, *Bull. Ac. royale de méd. de Belgique*, 1905.

ces éléments varient suivant les espèces. Ces variations, considérables quand on compare des espèces éloignées, existent encore, très évidentes, quand on compare des espèces voisines, par exemple, différents mammifères. Dans chaque espèce, à l'état sain, les dimensions oscillent entre des limites très étroites, de sorte que cette notion a pu être appliquée chez l'homme à l'étude des modifications pathologiques du sang.

Les hématies étant des corps discoïdes très aplatis, de forme très régulière, l'étude du diamètre donne, à elle seule, un renseignement important, d'autant plus que chez les Mammifères, ce sont des disques circulaires, dont l'épaisseur est à peu près proportionnelle au diamètre.

L'évaluation du diamètre des globules rouges peut être faite de deux façons : soit sur des hématies libres dans une préparation de sang frais, soit sur des hématies simplement desséchées sur lame. La première méthode, en raison de la mobilité des éléments et de leurs déformations spontanées, doit être réservée à des cas particuliers, par exemple à l'étude des modifications du diamètre apparent sous l'influence des solutions salines. La seconde est la seule qui donne des résultats suffisamment comparables (1).

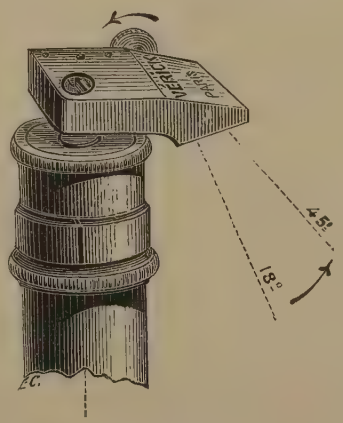


Fig. 104. — Chambre claire à angle variable, de Malassez.

La méthode consistera donc à dessiner, à la chambre claire, à un grossissement suffisant et connu, un certain nombre de globules rouges desséchés sur lame et à en mesurer les dimensions sur le dessin obtenu.

Mesure du grossissement. — Au lieu de dessiner d'abord les globules et d'évaluer ensuite le grossissement, il vaut mieux disposer à l'avance le microscope de telle sorte que le grossissement soit connu et corresponde à un chiffre simple : 1.000 par exemple. On se sert de la chambre claire de Malassez (2) et d'un micromètre objectif (1 millimètre divisé en 100 parties). Le microscope est incliné à 45 degrés;

(1) C'est au moyen de cette méthode que furent faites les premières mensurations précises, par Prévost et Dumas (1821), Wagner (1835), Mandl (1838) et Gulliver (1846) (Cf. Milne Edwards, *Leçon sur la Physiologie et l'Anatomie comparée de l'homme et des animaux*, Paris, 1857). A cause de leur minceur, les globules sont peu modifiés dans leur diamètre par la dessiccation ; il existe une légère augmentation de diamètre due à l'aplatissement ; mais cette cause d'erreur est compensée par la précision de la méthode qui donne des résultats toujours comparables.

(2) Malassez, *Archives de physiologie*, 1884 et 1886.

on dessine les divisions du micromètre sur le papier. Par tâtonnements, et en se servant d'un système à sec, en variant l'objectif, l'oculaire et le tirage du tube, on s'arrange de telle sorte que chaque division du micromètre donne sur le papier une image de 1 centimètre de diamètre. Ce grossissement de 1.000 diamètres étant obtenu, on remplace le micromètre par la préparation de sang desséché qu'on observe telle quelle, dans l'air.

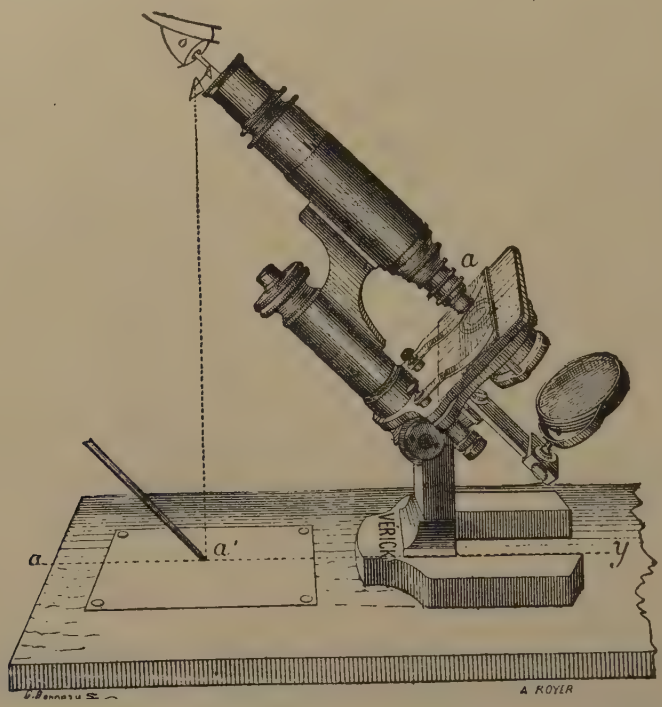


Fig. 105. — Manière de dessiner à 45° avec la chambre claire de Malassez.

Évaluation du diamètre moyen. — On dessine les contours d'un certain nombre de globules : 100 par exemple (1). Le diamètre de chaque globule est ensuite mesuré sur le papier. Pour les globules elliptiques, on mesure les deux diamètres. Pour les mensurations des globules de l'homme et des mammifères, on se servira avec avantage de la règle globulimétrique de Malassez (2), lame transparente, sur laquelle sont gravés des cercles dont les dimensions vont progressivement de 5 mm. à 15 mm. par 0 mm. 25. En superposant ce calibre au dessin, on évalue rapidement la dimension ; on prend la moyenne des chiffres obtenus et, en divisant par le grossissement (1.000 par exemple), on a le diamètre moyen.

(1) Il importe que le papier sur lequel on dessine reste exactement à la même distance de la chambre claire que lorsque le grossissement a été établi ; le dessin sera nécessairement plus petit si le papier est relevé au-dessus de la table.

(2) Malassez, *Soc. de Biologie*, 5 janvier 1889.

Diamètre moyen des hématies chez les Mammifères. — Voici la moyenne des résultats que m'a donné l'étude du sang de quelques mammifères (1) :

Éléphant africain	9,1
Homme	7,5
Chien	7,3
Cobaye	7
Lapin	6,5
Rat	6,5
Porc	6,1
Vache	6,1
Chat	6
Cheval	5,7
Mouton	5
Chèvre	3,7

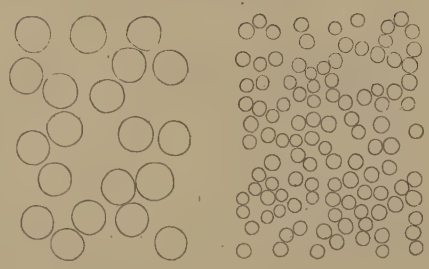


Fig. 106 et 107. — Diamètres extrêmes des hématies chez les mammifères. A gauche, sang d'éléphant (9 μ); à droite, sang de chèvre (3μ7). 500 diam.

Ces chiffres diffèrent peu de ceux qui ont été donnés par *Gulliver* (2), *Welcker* (3). *Malassez* (4), *Vibert* (5), etc. Très peu de mammifères ont des globules plus gros que ceux de l'homme (6). La plupart ont des globules plus petits.

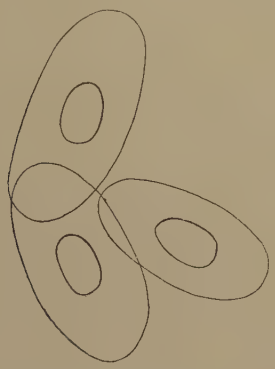


Fig. 108. — Sang de protée. Globules rouges. 500 diam.

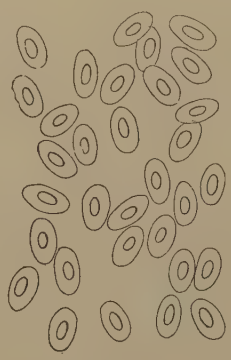


Fig. 109. — Sang de canard. Hématies. 500 diam.

Diamètre moyen des hématies nucléées. — Voici maintenant les

(1) Exprimés en millièmes de millimètre ou μ.
(2) Milne-Edwards, *Leçons sur la Physiologie*, 1857, I, p. 83.
(3) Welcker, *Zeitschrift f. rat. medicin*, XX, 1863.
(4) Malassez, *Archives de physiologie*, 1877.
(5) Vibert, *Archives de physiologie*, 1882.
(6) C'est l'éléphant et la baleine qui possèdent les plus gros globules. Le chiffre que j'ai trouvé chez l'éléphant d'Afrique (9 μ, 1) concorde avec les déterminations de Gulliver (9 μ, 2) et de Welcker (9 μ, 4) chez *Elephas indicus*. Gulliver a trouvé 8 μ, 2 chez une baleine (*Balæna boops*) et 8 μ, 8 chez le paresseux (*Bradipus didactylus*). Les chiffres les plus faibles ont été trouvés chez un ruminant : *Moschus javanicus*, chez lequel Gulliver a donné 2 μ et Welcker 2 μ, 5. Pour les globules elliptiques des Mammifères, Welcker a donné 8 μ de long et 4 μ de large chez *Auchenia Lama* et Gulliver a donné des chiffres assez voisins chez *Camelus dromedarius* et *C. bactrianus*.

chiffres que j'ai trouvés chez quelques vertébrés à globules nucléés, chiffres qui concordent exactement avec les déterminations antérieures (1) :

	Grand diamètre.	Petit diamètre.
	—	—
Protée	55,6	28
Axolotl	38,9	22,1
Salamandre maculée	38,5	22,1
Grenouille rousse	19,7	12,7
Caméléon	16	9,1
Canard	12,6	7

Les suivants sont empruntés à *Welcker :*

	Grand diamètre.	Petit diamètre.
	—	—
Protée	58	34
Salamandre maculée	37,8	23,8
Triton crêté	29,3	19,5
Cyprinus gobio	17,7	10,1
Lacerta agilis	15,9	9,9
Poule	12,5	7,6

Ces globules rouges ont, comme on le voit, des dimensions bien supérieures à ceux des Mammifères. Les plus gros appartiennent aux Batraciens urodèles ; puis, en ordre décroissant, viennent ceux des Sélaciens, des Batraciens anoures, des Reptiles, des Poissons osseux et des Oiseaux.

Rapport du diamètre avec l'activité physiologique. — Il n'existe pas de rapport certain entre la taille des animaux et la dimension de leurs hématies (2). Il existe, au contraire, une relation évidente entre la dimension des globules, leur nombre et les besoins respiratoires de l'animal. Les Mammifères, dont les besoins respiratoires sont considérables, ont des globules plus petits et plus nombreux que ceux des Vertébrés inférieurs. Parmi les Mammifères, le nombre et la grandeur des hématies marchent aussi de pair ; les espèces à petits globules ont des hématies nombreuses. Malgré des exceptions, ces faits sont aussi en rapport avec le degré d'activité de l'animal et c'est chez les Ruminants coureurs (chèvre, cerf, chevrotain, antilope), qu'on trouve les globules les plus petits et les plus nombreux.

Si on compare entre eux les animaux à globules nucléés, on constate que les

(1) Voir de nombreuses déterminations dans Milne-Edwards, *l. c.* — Pour les globules des Cyclostomes, Welcker a donné 11 μ 7 chez *Ammocetes branchialis* et 15 μ chez *Petromyzon marinus.*

(2) Il est cependant remarquable de voir que chez les Mammifères, c'est l'éléphant qui présente les plus gros globules. En comparant des animaux appartenant à une même famille naturelle, on peut trouver des coïncidences de ce genre chez les animaux à globules nucléés. De gros oiseaux, comme l'autruche et le casoar, ont de gros globules, tandis que de petits oiseaux comme les passereaux possèdent les plus petites hématies. La taille de l'animal intervient donc probablement dans une certaine mesure, ce qui est en rapport avec les besoins respiratoires, plus grands chez les petits animaux.

globules les plus gros et les moins nombreux appartiennent aux Batraciens urodèles dont l'activité est très faible, tandis que les plus petits appartiennent aux Oiseaux. La diminution de volume et l'augmentation de nombre, pour un même poids de pigment respiratoire, multiplie les surfaces d'échange; malgré certaines exceptions qui tiennent à des circonstances accessoires, il y a là une adaptation évidente à la fonction (1) (voir chap. IV).

Évolution du diamètre des hématies au cours du développement. — Les premiers globules rouges nucléés des embryons de mammifères sont des cellules beaucoup plus volumineuses que les hématies sans noyaux de l'adulte (2). Même si on compare les hématies définitives sans noyau d'un embryon déjà très développé avec celles d'un adulte de même espèce, la différence est sensible et au profit de l'embryon. Ainsi, *Malassez* (3) trouve comme diamètre moyen de l'hématie : 7 μ 7 chez un homme adulte et 9 μ 2 chez un fœtus humain de quatre mois et demi. Cette diminution du diamètre moyen des hématies au cours du développement se poursuit, même après la naissance, chez certaines espèces, surtout chez celles dont la parturition est courte et dont les petits naissent peu développés (4). Voici, par exemple, les chiffres que j'ai obtenus chez le rat blanc :

Embryon de 16 mm.	9,7
1er jour de la vie extra-utérine	8,3
8e jour.	8
15e jour	7,9
30e jour	6,7
3 mois.	6,6

On peut observer aussi des faits analogues chez le chat, la chèvre (5), le lapin (6) et même chez l'homme (7).

Diamètre moyen des hématies de l'homme. — Le diamètre moyen des hématies de l'homme est voisin de 7 μ 5 (8). Les diamètres extrêmes oscillent en général entre 6 et 9 μ. Les globules qui dépassent ces limites sont exceptionnels. Dans le sang normal, les globules très petits et très gros sont rares; les dimensions de la plupart des hématies se rapprochent du diamètre moyen et oscillent entre 7 et 8 μ. Cette uniformité cesse dans les cas où le diamètre moyen s'éloigne de la normale, dans les états pathologiques ; les globules de

(1) C'est chez les formes les plus anciennes de Vertébrés (Urodèles, Sélaciens) qu'on rencontre aussi les plus gros globules.

(2) Le fait a été remarqué depuis longtemps par Prévost, Wagner, Gulliver, Bischoff, etc. Voir Milne-Edwards, *l. c.*, I, p. 53.

(3) Malassez, *Soc. de Biologie*, 5 janvier 1889.

(4) Le fait est analogue à celui que nous avons montré plus haut pour le nombre.

(5) Jolly, *Soc. de Biologie*, 27 juillet 1907 ; Welcker, *l. c.*

(6) Malassez, *Cours du Collège de France*, 1893, et *Exposé de titres*, p. 42.

(7) Saragea, *Soc. de Biologie*, 11 février 1922.

(8) J'ai trouvé en général des chiffres légèrement inférieurs à ceux qui ont été donnés par Welcker (7 μ, 7) et par Malassez (7 μ, 7).

taille extrême deviennent beaucoup plus nombreux (1). Comme chez les autres mammifères, le diamètre moyen des hématies est plus grand chez le fœtus que chez l'enfant. D'après les recherches de *Saragea*, il est, chez l'enfant, à la naissance, encore sensiblement plus grand que chez l'adulte (8,6 au lieu de 7,5). Il s'abaisse ensuite régulièrement jusqu'à la fin du premier mois (8,1). Cette chute continue lentement jusqu'à la fin de la deuxième année environ ; la courbe remonte ensuite pour atteindre à l'âge de 30 à 50 ans le chiffre moyen de 7,5 (2).

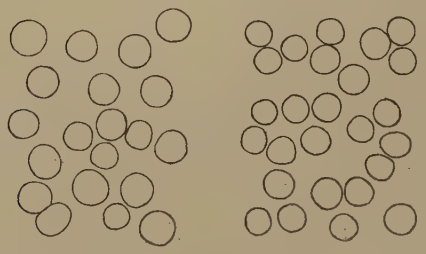


Fig. 110 et 111. — Différences de diamètre des hématies au cours du développement. A gauche, sang d'un fœtus humain de 5 mois (8 μ) ; à droite, sang d'un sujet de 23 ans (7 μ 6). 500 diam.

Les différences assez considérables qui existent entre les dimensions des globules rouges de l'homme et celles de beaucoup d'animaux ont été quelquefois utilisées en médecine légale pour reconnaître le sang humain. Toutefois, il faut apporter à de pareilles conclusions beaucoup de prudence. Un certain nombre de mammifères domestiques ont des globules dont le diamètre est très voisin de celui de l'homme (chien, lapin, cobaye). Il est donc toujours impossible d'affirmer, d'après le diamètre des éléments, qu'une tache est formée de sang humain (3) ; on peut seulement, dans certains cas, le supposer, et il faut que la couche de sang ait été assez mince, se soit desséchée assez vite pour que les

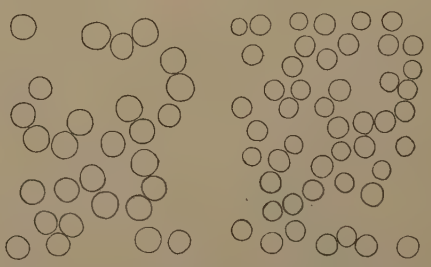


Fig. 112 et 113. — Différences de diamètre des hématies chez le jeune et chez l'animal adulte. A gauche, sang de chat nouveau-né (6 μ 5) ; à droite sang de chat âgé de 8 mois (5 μ 5). 500 diam.

(1) Si l'on évalue le pourcentage des globules de différents diamètres et qu'on porte en ordonnées les diamètres, en abcisse le pourcent des globules de chaque diamètre, on obtient ainsi des courbes qui à l'état normal, sont à sommet aigu ; lorsque le diamètre se modifie, dans les maladies, les globules qui s'éloignent du diamètre moyen deviennent plus nombreux et la courbe s'étale.

(2) Saragea, *S. de Biologie*, 11 février 1922. Vers l'âge de 15 ans, au moment de la puberté, la courbe subirait un relèvement passager. Chez les gens âgés, on trouve des chiffres plus forts qu'à l'âge moyen de la vie.

(3) Vibert, *Archives de physiologie*, 1882.

globules soient conservés (1). On peut quelquefois affirmer que la tache provient du sang d'un animal autre que l'homme : lorsqu'il s'agit par exemple de globules elliptiques nucléés (sang d'oiseau ou de poisson), dont la forme et le noyau sont souvent reconnaissables.

Dans des cas très favorables, on pourra supposer ou affirmer avec certaines réserves que la tache provient du sang d'un mammifère autre que l'homme, lorsqu'il s'agit d'un mammifère dont les globules sont nettement plus petits que ceux de l'homme (bœuf, mouton, chèvre).

Variations du diamètre moyen dans les états pathologiques. — Le diamètre moyen des hématies augmente à la suite des grandes hémorragies (2). Le fait a été constaté chez l'homme et aussi chez les animaux à la suite des hémorragies expérimentales. L'augmentation du diamètre moyen a été observée par *Malassez* dans l'intoxication saturnine, le choléra, la leucémie, la chlorose. Mais c'est dans les anémies pernicieuses que cette modification est surtout remarquable et constante. L'augmentation du diamètre moyen a été constatée par *Vaquez* (3) dans le myxœdème infantile et dans la cyanose congénitale où elle paraît un caractère constant (4). *Vaquez* a vu aussi l'augmentation de diamètre dans certains ictères (5).

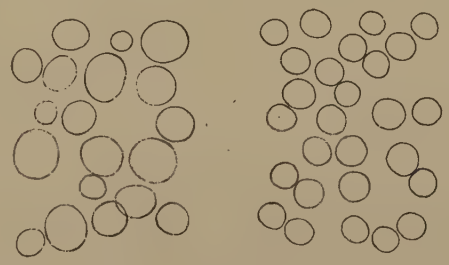


Fig. 114 et 115. — Augmentation du diamètre moyen des hématies dans l'anémie pernicieuse. A gauche, sang d'anémie pernicieuse ; à droite, sang d'homme normal. 500 diam.

Dans presque tous les cas où le diamètre moyen est modifié, la régularité du diamètre des hématies disparaît ; les globules de taille extrême augmentent de nombre (*anisocytose*). Cette irrégularité du diamètre s'accompagne en général, sur les préparations définitives, de déformations. C'est à l'ensemble de ces caractères qu'on a donné le nom de *poïkilocytose*.

(1) La tache est délayée avec une solution saline contenant une petite proportion de fixateur (sublimé ou formol). Le liquide de Marcano employé pour la numération convient très bien. On peut aussi employer un liquide au sublimé (bichlorure de mercure 0,5, chlorure de sodium 2, eau 100).

(2) Malassez, *Exposé de titres*, p. 44. — Jolly, *Archives de méd. exp.*, juillet 1901.

(3) Vaquez, *Soc. de Biologie*, 2 mars 1895 ; *Soc. méd. des hôpitaux*, 22 janvier 1897.

(4) Tandis que dans l'érythrémie, on n'observe pas cette modification (voir plus haut).

(5) Vaquez, *Soc. de Biologie*, 19 juillet 1902.

Dans les cas de poïkilocytose très accentuée, comme on le voit par exemple dans certaines chloroses, on observe des globules de très petite taille, ne dépassant pas 2 ou 3 μ et qui sont probablement des fragments de globules rouges (*schistocytes*) (1).

L'augmentation du diamètre moyen et l'inégalité du diamètre qu'on observe après les grandes hémorragies et dans un certain nombre d'anémies peuvent être considérées comme des phénomènes en rapport avec la régénération du sang. Mais les modifications du plasma jouent probablement aussi un certain rôle, si l'on s'en rapporte aux résultats obtenus in vitro (2).

Modifications du diamètre apparent des hématies « in vitro ». — Il faut distinguer les modifications que nous venons d'étudier, qu'on observe *in vivo*, avec celles qu'on produit *in vitro* par l'action de certains liquides sur les globules rouges et qui résultent d'actions osmotiques. Les solutions nettement hypotoniques gonflent les globules rouges, les rendent sphériques et, par conséquent, causent une diminution du diamètre apparent très considérable quand on observe le sang frais. Cette diminution de diamètre s'observe encore avec les solutions salines isotoniques qui rendent beaucoup de globules sphéro-épineux. Les solutions faiblement hypertoniques (2 à 5 p. 100 NaCl) produisent à peu près le même résultat. Lorsqu'on emploie, au contraire, des solutions fortement hyperto-

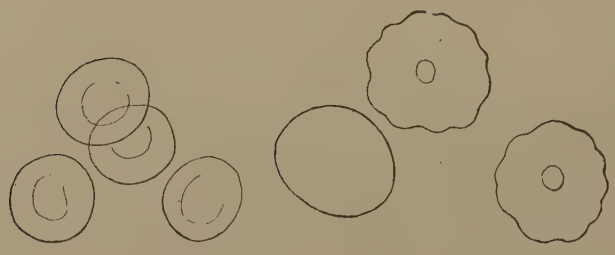


Fig. 116 Fig. 117

Fig. 116. — Sang d'homme fixé frais par les vapeurs osmiques. Contours de quatre hématies. 1.500 diam.

Fig. 117. — Le même sang mélangé à une solution NaCl à 10 p. 100 puis fixé frais par les vapeurs osmiques. Contours de trois hématies. Augmentation considérable de diamètre produite par la solution hypertonique. 1.500 diam.

(1) Les observations anciennes de microcytémie sont sujettes à révision à cause de la technique employée; la microcytémie de l'hyperglobulie des altitudes rentre dans ce cas. Il ne faut pas confondre des microcytes véritables avec des globules rouges gonflés et devenus sphériques, et dont par conséquent le diamètre, dans le sang frais, apparaît fortement diminué.

(2) La privation d'eau et les pertes d'eau produisent *in vivo* une augmentation du diamètre des hématies (Saragea, *S. de Biologie*, 22 juillet 1922). Cf. aussi Marcano (*J. de phys.*, 1899).

niques (5 à 20 p. 100 NaCl), on prive les globules d'une partie de leur eau; ils s'aplatissent et leur diamètre apparent augmente considérablement (voir ch. II). Comme ils sont minces et qu'ils n'ont pas perdu leur élasticité, leurs bords se recroquevillent souvent, simulant des hématies sphéro-épineuses, de diamètre apparent très petit ; c'est ce qui explique les résultats contradictoires obtenus par les auteurs avec l'emploi de différentes solutions hypertoniques. Ces faits se relient à l'étude des modifications du volume des hématies que nous étudierons un peu plus loin (1).

SURFACE ET VOLUME DES HÉMATIES

Evaluation de la surface globulaire. — L'épaisseur des globules rouges est assez facile à mesurer dans le sang frais lorsqu'on observe des hématies vues de champ. Elle a été calculée par *Welcker* qui a donné chez l'homme, comme moyenne, 1 μ 9 pour un diamètre de 7 μ 7. Si les globules rouges avaient la forme de cylindres parfaits, leur surface et leur volume seraient faciles à calculer. Leur bord arrondi, la dépression de leurs deux faces compliquent un peu les choses. *Welcker* a tourné la difficulté de la façon suivante : il taille un cylindre de plâtre de mêmes proportions que l'hématie, mais de volume considérable (5.000 fois grossi); il arrondit ensuite ses bords et déprime légèrement ses faces ; il le pèse avant et après ce modelage ; la perte de poids est d'environ 19,3 p. 100. Il réduit les chiffres trouvés pour le cylindre dans la même proportion ; les volumes étant proportionnels aux poids, il trouve ainsi, pour l'homme, 0 mmc. 000.000.072. Pour l'estimation de la surface, il se sert d'une méthode analogue, et calcule la différence de poids des morceaux d'un papier homogène dont il a revêtu d'une part le cylindre, d'autre part le modèle globulaire 5.000 fois grossi. Il obtient chez l'homme, pour un globule, 0 mmq. 000.128, soit 640 mmq. dans 1 millimètre cube de sang contenant 5 millions de globules rouges. Par des calculs de ce genre, *Welcker* a trouvé chez l'homme 2.816 mq. pour l'ensemble de la surface globulaire du corps de l'homme et 81 mq. pour la surface totale des globules qui pénètrent dans le poumon en une seconde. En faisant les mêmes opérations chez quelques espèces

(1) Malassez avait observé que les globules rouges sont un peu plus petits dans le sang veineux que dans le sang artériel. Cette légère diminution de diamètre, en rapport avec un gonflement par absorption de l'eau du sérum, paraît être due à l'acide carbonique. Elle est plus accentuée dans le sang veineux de la stase. Ces modifications peuvent être reproduites *in vitro*, en agitant du sang avec de l'acide carbonique. Les globules se gonflent et tendent à devenir sphériques. Le phénomène est reversible ; les globules reprennent leur diamètre antérieur lorsque le sang est agité avec de l'oxygène. (Hamburger, *Osmotischer Druck und Ionenlehre*, I, Wiesbaden, 1902.) Ces modifications sont du même ordre que celles qu'on produit *in vitro* en gonflant les globules par l'action des acides dilués. On a signalé récemment des variations diurnes du diamètre globulaire chez l'homme sain, variations qui sont probablement en rapport avec les variations diurnes de l'alcalinité du sang. Voir Price-Jones, *J. of. Path. and Bact.*, 1920.

animales, *Welcker* a pu faire des comparaisons d'un intérêt physiologique évident. Les chiffres suivants sont tirés de ses travaux (1).

Espèce animal.	Nombre d'hématies par mmc.	Diamètre.	Surface globulaire dans 1 mmc. de sang.
Loir	8.410.000	»	704 mmq.
Homme	5.000.000	7,7	640 —
Éléphant	2.020.000	9,4	356 —
Pigeon	2.010.000	13,7 et 7,3	369 —
Grenouille rousse	404.000	21,8 et 15,6	243 —
Triton crêté	103.000	29,3 et 19,5	106 —
Protée	36.000	58 et 34	60 —

Les globules nombreux et petits multiplient la surface des échanges et sont en rapport avec leur intensité.

Évaluation du volume globulaire par la sédimentation. — Si on laisse reposer dans une éprouvette du sang défibriné, les globules rouges forment un dépôt et le sérum surnage (2); le dépôt de globules occupe un volume qui est à peu près la moitié du volume de l'échantillon de sang (48 à 50 p. 100). Ce chiffre est inférieur à celui qu'on obtient par le calcul en prenant le volume d'un globule rouge calculé par *Welcker* (voir plus haut). En partant de cette donnée, le chiffre obtenu est voisin de 36 p. 100 pour un individu possédant millions de globules rouges par mmc. Cette différence tient à deux auses : aux déformations que subissent plus ou moins les globules abandonnés à eux-mêmes et aux espaces interglobulaires. Cette différence est encore plus grande lorsque, pour obtenir la sédimentation sans défibriner le sang, on ajoute à ce liquide des solutions salées qui empêchent la coagulation. C'est qu'en effet, ces solutions, même quand elles conservent l'hémoglobine, déforment plus ou moins les globules, et ont une tendance à les transformer en sphères épineuses. Le volume du sédiment sera donc toujours plus grand que le volume réel occupé par les globules dans le sang circulant. Cependant, il va de soi que plus le sang sera riche en globules, plus le dépôt sera considérable. C'est ce qui a donné l'idée de se servir de la sédimentation pour évaluer indirectement le nombre des globules. Mais cette évaluation ne peut remplacer la numération directe. Les liquides mélangés au sang ne laissent pas les globules intacts ; les espaces

(1) Welcker, *Zeitschrift f. rat. Medicin*, XX, 1863.

(2) Chez le cheval, dont le sang coagule très lentement, on peut obtenir la sédimentation des globules dans un segment de veine isolé entre deux ligatures et qu'on suspend, verticalement, dans un endroit frais; les globules se déposent et le plasma surnage ; on aperçoit par transparence la limite supérieure du dépôt globulaire.

interglobulaires sont agrandis par le gonflement des globules ; le tassement du dépôt sera plus ou moins grand suivant qu'on aura employé ou non la force centrifuge ; enfin le volume des leucocytes est compris dans le dépôt, ce qui peut être une cause d'erreur s'ils sont très augmentés de nombre. Le volume du sédiment n'exprime donc pas le volume vrai des hématies ; les variations du sédiment ne sont pas parallèles aux variations du volume globulaire.

On a cherché à répondre à ces objections en employant des liquides fixateurs des globules rouges (1) et en utilisant la sédimentation spontanée pour éviter les variations de tassement dues à la centrifugation.

Sédimentation spontanée. — L'évaluation du volume globulaire a été obtenue en effet de deux façons : soit en se servant d'appareils dans lesquels le mélange sanguin est soumis à la centrifugation (sédimentation mécanique), soit en laissant le mélange déposer spontanément dans une éprouvette (sédimentation spontanée).

La sédimentation par centrifugation est obtenue par les *hématocrites* (2). Ils se composent essentiellement d'un tube capillaire gradué dans lequel est introduit la dilution sanguine et qui, porté par une armature métallique, est soumis, horizontalement, à une centrifugation énergique. L'hématocrite sera avantageusement remplacé par les procédés de sédimentation spontanée (*Biernacki*, *Ottfried Müller*, *Marcano*).

La méthode de *Marcano* (3) consiste à diluer d'abord le sang au moyen d'une pipette avec une solution salée formolée :

Solution de sulfate de soude D 1022	100 cc.
NaCl	1 gr
Formol à 40 p. 100	3 cc.

La dilution est faite à 25 p. 100. Le mélange est déposé dans un petit vase gradué de forme conique ; le vase est bouché et abandonné au repos. Lorsque la chute du sédiment est terminée, on lit le nombre de divisions qu'il occupe. En multipliant par 4 le chiffre trouvé, on obtient le volume globulaire pour 100 de sang.

Marcano a obtenu, à l'état physiologique, les chiffres suivants, qui représentent des moyennes :

	Nombre.	Volume.	Hémoglobine.	Densité.
	—	—	—	—
Homme.	4.535.999	51,4	12,4	1.058,8.
Femme.	4.179.066	49,2	12,0	1.057,2.
Lapin.	4.168.964	48,2	12,2	1.051.

(1) Hedin, Daland employaient le liquide de Müller ou les solutions de bichromate de potasse à 2,5 p. 100. Ces fixateurs ont été avantageusement remplacés par les solutions salées formolées de Marcano qui conservent la forme des hématies sans produire de coagulation.

(2) L'idée de l'hématocrite est due à Blix (1885). Le premier appareil fut réalisé par Hedin sur le modèle des lactocrites employés déjà dans l'industrie du lait, et utilisé surtout par Daland.

(3) Marcano, *J. de phys. et de path gén.*, mars 1901.

La méthode de Marcano répond aux principales objections qui ont été faites à la sédimentation, mais elle ne peut remplacer ni la numération directe ni la mensuration directe du diamètre globulaire. Son application la plus intéressante est l'étude de la participation du plasma aux changements de la densité totale du sang.

A côté de ces méthodes directes on a proposé, pour l'évaluation du volume globulaire et l'évaluation du poids des globules, connaissant leur densité, d'autres méthodes qui sont des méthodes physico-chimiques reposant sur la mesure de la conductivité électrique du liquide interglobulaire, ou basées sur la règle des mélanges. Ces méthodes, passibles du reste de nombreuses objections, ne concernent guère que l'analyse chimique du sang (1).

Influence du milieu sur le volume globulaire. — Le volume globulaire est modifié par les changements de la concentration moléculaire du milieu. Lorsque la concentration s'abaisse, le globule absorbe de l'eau, se gonfle, tend à prendre la forme sphérique. Lorsque la concentration s'élève, le globule tend à perdre de son eau, et à s'aplatir. Les variations du diamètre globulaire, étudiées sur le sang frais et liquide, expriment donc, jusqu'à un certain point, les variations de volume. Cependant ces résultats ne se produisent qu'entre certaines limites. En particulier, l'aplatissement n'est visible qu'avec des concentrations très élevées qui ne peuvent être réalisées que *in vitro*. La présence des acides en petite proportion tend à augmenter le volume des hématies qui prennent la forme sphérique et diminuent de diamètre. L'augmentation de l'acide carbonique dans le sang produit le même effet *in vitro*. *In vivo*, le volume globulaire est un peu plus grand dans le sang veineux que dans le sang artériel ; le diamètre apparent est, par conséquent, plus petit. Ce fait est en rapport avec la quantité plus grande d'acide carbonique dans le sang veineux (2).

MASSE TOTALE DU SANG

Évaluation de la masse totale par la numération. — La numération des globules rouges a été appliquée par *Malassez* à la détermi-

(1) Voir, pour la critique de ces méthodes, et sur une méthode nouvelle, reposant sur la détermination du poids et du volume globulaire par des mesures de variation de poids sec ou de densité : Mayer et Schaeffer, *J. de physiologie et de pathologie gén.*, septembre 1913, p. 984. Dans les analyses chimiques, les résultats sont rapportés au poids sec du dépôt globulaire ou au poids humide ou poids globulaire vrai. Chez l'homme et les mammifères 100 grammes de sang contiennent environ 33 p. 100 de globules en poids vrai ; ces 33 grammes contiennent environ 21 grammes d'eau et 12 grammes de résidu sec ; les 66 grammes de plasma contiennent environ 6 grammes de résidu sec, ce qui donne un résidu sec total de 18-20 p. 100. Mayer et Schaeffer ont déterminé, pour un certain nombre d'espèces animales, les rapports du poids sec au poids globulaire vrai. Il oscille pour les mammifères entre 0,30 et 0,36. A l'aide de ces coefficients on peut transformer le poids sec obtenu en poids humide.

(2) Voir Hamburger, Osmotischer Druck und Ionenlehre, I, Wiesbaden, 1902. Les globules se gonflent, malgré l'augmentation de la concentration moléculaire du sang veineux. Le volume de l'hématie ne dépend donc pas seulement de la pression osmotique du milieu mais encore d'autres facteurs et en particulier de la présence d'ions capables de modifier l'état électrique de la paroi globulaire (P. Girard, *C. R. Ac. des sc.*, 5 mai 1913).

nation de la masse totale du sang, c'est-à-dire à la quantité de sang contenue dans tout le corps (1). Cette notion, fort importante au point de vue expérimental, est assez difficile à obtenir directement parce qu'il n'est pas possible de soustraire à un animal, par l'ouverture des gros vaisseaux, la totalité de son sang.

La numération des globules rouges permet une évaluation approximative. On choisit un animal de petite taille (cobaye, rat, lapin, pigeon, etc.), on le pèse et on compte le nombre des globules rouges par mmc. dans le sang d'un vaisseau superficiel. On saigne l'animal par l'ouverture de la carotide ; le sang est reçu dans un volume connu de liquide de Marcano de telle sorte que la dilution soit approximativement de 1 p. 100 ; par exemple pour un rat, les 5 à 10 cc. qu'on peut soutirer de cette façon sont reçus dans 1 litre de liquide de Marcano. Le système circulatoire est ensuite lavé avec du liquide de Marcano ; ce lavage entraîne les globules, l'eau de lavage est soigneusement recueillie. Après avoir enlevé soigneusement la vésicule biliaire, la peau, le tube digestif, on découpe l'animal en petits morceaux dans du liquide de Marcano. Ce liquide est filtré sur un linge et mélangé aux autres échantillons recueillis. On ajoute du liquide de Marcano de façon à former un volume total simple et tel que la dilution du sang soit approximativement de 1 p. 200 à 1 p. 400. De cette dilution, bien brassée, on prend un échantillon dans lequel on compte les globules. On obtient ainsi par un simple calcul le nombre total des globules de l'animal, d'où il est facile de déduire le nombre des globules par unité de poids de l'animal et par conséquent la masse totale du sang.

Soit, par exemple, un rat pesant 200 grammes (2) dont le sang de l'oreille contenait, avant l'expérience, 10.000.000 de globules rouges par mmc. Le volume total du liquide de dilution employé est 3 litres, contenant 30.000 hématies par mmc. Le nombre total sera $V \times 30.000 = 90.000.000.000$. Le nombre par gramme d'animal (*capacité globulaire*), sera 450.000.000. Le *volume total* du sang sera :

$$\frac{\text{Nombre total}}{\text{Nombre des globules rouges par mmc.}} = 9 \text{ cc.}$$

Ici, le volume est évalué d'après le nombre des hématies contenues dans le sang périphérique. Comme il y a toujours moins de globules dans le sang profond, les volumes obtenus sont plus forts si on a pris comme point de départ les chiffres du sang profond ; on peut prendre la moyenne de deux déterminations, une faite pour le sang superficiel, une pour le sang profond ; pour le rat, on prendra par exemple jugulaire et carotide, pour le lapin, artère et veine auriculaires, etc.

Connaissant le volume du sang, on peut, à l'aide de la densité, obtenir le poids du sang et le rapport du poids du sang au poids du corps. Soit ici la densité = 1.050. Le poids total sera 9 gr. 45, ce qui donne environ 5 p. 100 pour le poids du corps.

(1) Malassez, *Archives de physiologie*, 1874 et 1875.

(2) Jolly et Stini, *Soc. de Biologie*, 20 mai 1905. Malassez employait pour l'opération une solution de sulfate de soude. Il est indispensable d'employer une solution fixatrice (liquide de Marcano au formol) pour empêcher la destruction d'un certain nombre de globules. On enlève environ les deux tiers du sang par la saignée, à peu près le tiers par le lavage des vaisseaux, et un trentième par le découpage.

Évaluation de la masse totale par la méthode de Welcker. — La méthode de Welcker ressemble à la précédente; mais au lieu d'employer la numération des globules rouges, on dose l'hémoglobine par la colorimétrie (voir ch. IV).

Avant l'expérience, on dose l'hémoglobine dans un volume connu de sang; l'animal est ensuite sacrifié, son sang recueilli dans l'eau distillée (1), lavage qu'on prolonge jusqu'à ce que l'eau redevienne claire. L'animal est découpé en fragments qu'on exprime doucement dans l'eau distillée. L'hémoglobine totale est dosée dans l'ensemble des eaux de lavage; en comparant cette évaluation à la première, il est facile d'obtenir le volume total du sang : soit P, le poids total de l'hémoglobine, p le poids d'hémoglobine dans 100 cc. de sang :

$$V = \frac{P \times 100}{p}.$$

Cette méthode donne des résultats qui concordent assez bien avec la première; les chiffres obtenus sont parfois un peu plus forts, à cause de l'hémoglobine musculaire qui est en partie comprise dans le dosage.

Procédés indirects d'évaluation de la masse totale. — Ces méthodes consistent à évaluer soit l'hémoglobine, soit le nombre des globules rouges contenus dans un volume déterminé de sang, dans un échantillon recueilli avant l'expérience, à injecter dans la circulation un volume connu de sérum ou d'eau salée isotonique, à prélever ensuite un autre échantillon qu'on traite comme le premier, et à comparer les deux résultats.

Pour qu'une pareille méthode ait quelque valeur, il faudrait qu'on puisse admettre que le liquide injecté se mélange parfaitement à toute la masse de sang, qu'il reste intégralement dans les vaisseaux et qu'il ne modifie pas les échanges osmotiques entre le sang et les tissus; or, ce sont là des postulats inexacts.

Le moins défectueux de ces procédés est celui de *Malassez*, qui repose sur la numération des globules rouges et avec lequel on injecte, non plus une solution salée ou du sérum sanguin, mais le sang même d'un animal de même espèce (2).

A côté des procédés indirectes reposant, soit sur la numération des globules rouges, soit sur le dosage colorimétrique de l'hémoglobine, il faut placer l'importante méthode de *Gréhant* et *Quinquaud* basée sur la propriété que possède l'oxyde de carbone de donner avec l'hémoglobine une combinaison plus fixe que l'oxyhémoglobine, et dans laquelle on évalue le volume de l'oxyde de carbone fixé par la masse de sang et la capacité respiratoire de deux échantillons de sang, l'un avant l'empoisonnement, l'autre après. On connaît le volume total de CO absorbé par 100 cc. de sang; on en déduit facilement le volume total du sang (3). Cette méthode a été appliquée à l'homme par *Haldane* et *Smith* (4).

(1) Et non dans l'eau salée comme on le dit quelquefois. Si les globules ne sont pas détruits, leur opacité donne au colorimètre des chiffres trop forts. On peut employer l'eau salée isotonique si l'on se sert d'opacimètres pour doser l'hémoglobine; — ou bien il faut ensuite étendre le mélange avec de l'eau distillée pour provoquer l'hémolyse.

(2) Pour le calcul et les formules, voir Malassez, *Archives de physiologie*, 1874.

(3) Gréhant et Quinquaud, *J. de l'anatomie et de la physiologie*, 1882. Gréhant, *les Gaz du sang*, p. 123. Morat et Doyon, *Traité de physiologie*, I, 1904, p. 514.

(4) Haldane et Smith, *J. of Phys.*, XXV, 1900. Cf. aussi Frank, in *Handbuch der phys. Methodik* de Tigerstedt et Fr. Müller, in *Handbuch der bioch. Arbeitsmethoden* de Abderhalden.

Masse totale dans la série animale. Variations physiologiques et pathologiques. — Les résultats obtenus par les méthodes précédentes ont été notés de différentes façons. Le plus souvent ils sont exprimés en volumes ou en grammes par gramme d'animal ou pour 100 gr. d'animal. On dira, par exemple, que le sang contient 0 cc. 045 par gramme d'animal ou (approximativement), 4 gr. 5 p. 100. Ou bien ils sont exprimés par fraction du poids total et l'on dira, par exemple, que la masse totale du sang est 1/20 du poids de l'animal. Enfin, dans la méthode qui repose sur la numération des globules rouges, on l'exprimera parfois par le nombre total des globules du corps ou par le nombre des globules contenus dans un gramme d'animal (capacité globulaire). Cette capacité globulaire diminue assez régulièrement, comme le nombre des globules dans la série animale, des Mammifères aux Batraciens urodèles (1).

Pour le volume du sang, *Malassez* a trouvé, par gramme d'animal, chez les Mammifères, 63 mmc., chez les Oiseaux 48 mmc. et chez les Poissons 13 mmc. Le volume du sang diminue donc au fur et à mesure qu'on descend la série animale, mais dans une proportion moindre que le nombre des globules rouges.

Chez les animaux de laboratoire, le volume total de sang est intéressant à connaître dans beaucoup d'expériences. Malgré de grandes différences dans les chiffres donnés par les auteurs, il est environ de 4 à 4,5 p. 100 chez le rat, de 4 à 5 p. 100 chez le lapin, de 5 à 8 p. 100 chez le chien (2), de 2 à 4 p. 100 chez la grenouille. Ces chiffres sont plus forts chez les jeunes animaux que chez les adultes. Le mammifère nouveau-né possède, par rapport à son poids, une quantité de sang plus grande, et la masse totale augmente progressivement avec l'âge jusqu'à l'état d'adulte. Dans le jeûne, malgré quelques divergences dans les résultats, la plupart des auteurs ont constaté une diminution de la masse totale, mais elle est le plus souvent proportionnelle à la diminution du poids du corps. Les pertes d'eau par dessiccation, diurèse, diarrhée, etc., diminuent notablement le volume du sang. Mais, d'après toutes les expériences, pour un même animal, la masse totale paraît être une valeur assez fixe dont les variations ont une grande tendance à se rétablir rapidement.

(1) La capacité globulaire exprime une notion absolue tandis que le volume total du sang ne peut être évalué que d'une manière approchée. D'après les expériences de *Ch. Richet* sur le chien, la masse du sang et le nombre total des globules pour une espèce donnée sont proportionnels à la surface du corps de l'individu et non à son poids.

(2) Brodin, Saint-Girons, et Richet (*Soc. de Biologie*, 6 juillet 1918, donnent, pour le chien, en poids, 61 à 73 p. 1.000, soit 1/14 environ. Richet (*Traité de Physiologie*) donne 1/15 pour le lapin et le canard.

La masse totale du sang n'est pas répartie également dans toutes les parties du corps; certains viscères en contiennent beaucoup plus que les muscles. Elle varie beaucoup suivant l'état de repos et d'activité de l'organe ; l'afflux de sang est beaucoup plus grand dans la glande qui sécrète et dans le muscle qui se contracte.

Chez l'homme, à l'état normal, d'après les évaluations faites par *Lehmann* et *Weber*, *Bischoff*, chez des suppliciés, on admet que le sang total représente environ 10 p. 100 du poids du corps. Par un procédé indirect, *Malassez* a trouvé 6.150 cc. de sang chez un homme sain de 27 ans pesant 62 kilogr., ce qui donne en volume, par 100 grammes, à peu près exactement 10 p. 100. C'est sur ces résultats qu'on s'appuie pour admettre que le volume total du sang, chez l'homme adulte, est d'environ 5 à 6 litres.

Des recherches plus récentes ont donné des chiffres notablement inférieurs à ceux indiqués par *Welker* et par *Malassez* pour l'homme (1). En se servant de la méthode indirecte avec l'oxyde de carbone, *Salvesen* (2) a trouvé, chez l'homme adulte, comme moyenne, 5,95 cc. pour 100 grammes soit 1/16,8 du poids du corps, soit 6 p. 100 du poids du corps, soit environ 4 litres de sang pour un homme de 65 kilogs. Avec la même méthode, le même auteur trouve, chez le lapin, 5 cc. pour 100 grammes, soit 1/20 du poids du corps. Ces chiffres paraissent très faibles. Chez les femelles gravides, les chiffres sont plus forts, la masse totale augmente; elle revient à la normale après le part.

Le volume total du sang diminue naturellement aussitôt après une hémorragie importante, et c'est cette diminution brusque de la masse qui est dangereuse, bien plus que la perte des globules; le volume total tend à se rétablir rapidement, de sorte que la diminution des globules est progressive dans la phase qui suit l'hémorragie. Elle est due à une dilution par l'apport du plasma des tissus. Dans certaines anémies chroniques, on admet couramment que la masse totale est diminuée; c'est là une question encore mal connue.

Densité du sang. — On obtient le poids spécifique du sang en pesant, dans des conditions rigoureuses de température, un volume connu de sang. Cette méthode peut être utilisée avec de petites quantités de sang, obtenues par piqûre d'une veinule superficielle ou du doigt chez l'homme. A la température extérieure de 15°, on remplit successivement le tube employé, d'eau distillée, puis de sang après l'avoir séché ; on obtient ainsi la densité du sang (pycnomètre de Schmaltz).

(1) Voir Grawitz, *Pathologie des Blutes*. 4e éd. 1911, p. 91.
(2) H. A. Salvesen *The Journal of biological Chemistry*, XL, 1919

L'évaluation peut être faite aussi au moyen de la méthode de Hammerschlag dont le principe a été donné par *Fano*. Elle consiste à faire, dans une éprouvette, un mélange de chloroforme et de benzol d'une densité d'environ 1050. On y fait tomber, avec une pipette, une petite goutte de sang. On ajoute, soit du benzol soit du chloroforme, jusqu'à ce que la goutte de sang (qui s'est prise en une gelée, formant une masse sphérique) soit en parfait équilibre dans le liquide La densité du liquide, évaluée ensuite au densimètre ou avec la balance de Mohr, donnera la densité du sang.

Le poids spécifique du sang est, chez l'homme sain, voisin de 1059, avec une petite différence en moins chez la femme. Les variations du poids spécifique tiennent peu au plasma ; elles dépendent beaucoup plus du nombre des globules et surtout de la quantité d'hémoglobine contenue dans le sang (1). Elles sont à peu près proportionnelles à la richesse du sang en hémoglobine. C'est ce qui explique que dans la chlorose on trouve un abaissement constant du poids spécifique qui peut coïncider avec un nombre de globules élevé. Dans les hyperglobulies, dans celles de la cyanose chronique, par exemple, le poids spécifique du sang est notablement élevé.

Viscosité du sang. — La viscosité du sang est exprimée par le temps que met le liquide à remplir un espace déterminé après avoir traversé un tube capillaire de longueur et de diamètre donnés, dans des conditions fixes de température et de pression. On compare la viscosité du liquide en expérience à celle de l'eau distillée, à la température du sang. L'appareil consiste essentiellement en un tube capillaire en U, dont chaque branche est surmontée d'un réservoir. La viscosité de l'eau à 38° étant égale à 1, la viscosité du sang de l'homme est en moyenne de 5, avec des variations de 1,3 à 9,2 à l'état pathologique.

La viscosité dépend surtout du nombre de globules ; elle est diminuée en général dans les anémies et augmentée dans les polyglobulies et chaque fois que, par une perte de liquide, le sang se concentre en globules.

Elle dépend beaucoup moins des substances colloïdes du plasma. Le plasma présente des oscillations plus considérables que celles du sérum. Les variations de la viscosité du sang et du plasma ne sont pas parallèles à celles de la densité qui dépendent surtout de la quantité d'hémoglobine (2).

(1) La densité varie donc, à l'état normal, avec la concentration globulaire, augmente avec les pertes d'eau du corps, diminue avec l'hydratation du sang par ingestion d'eau ou injection d'eau (voir plus haut ; voir aussi chap. XVIII).

(2) Voir A. Mayer, *Soc. de Biologie*, 21 décembre 1901, 22 mars et 21 juin 1902. — Roger, *Archives de méd. exp.*, XX, 1908. — Lisbonne et Margarot, *Archives des maladies du cœur*, VI, 1913. — Robert Tissot, *Folia hæmatologica*, IV, 1907. — Bence, *Zeitschrift f. klin. Medicin*, LVIII, 1906. — Fr Müller, *in Handbuch der bioch. Arbeitsmethoden* de Abderhalden. — Gay, Th. Paris, 1909. — Determann, *Zeitschrift f. klin. medicin*, LXX, 1910. — Waisser, *Folia hæmatologica*, XIX, 1915.

CHAPITRE IV

HÉMOGLOBINE
CRISTAUX DU SANG ET PIGMENTS D'ORIGINE SANGUINE

L'hémoglobine est la matière colorante rouge du sang. Le pigment est dissous dans le plasma de certains invertébrés, mais chez tous les Vertébrés, il est fixé sur les hématies. Lorsqu'on trempe dans l'eau une préparation de sang qui vient d'être desséchée simplement sur lame, les hématies disparaissent. Il en est de même si l'on porte une goutte de sang dans l'eau distillée ; l'eau se colore et les hématies ne sont plus visibles ; mais si, reprenant la lame qui a été trempée dans l'eau, on examine au microcospe, après coloration, les points où l'action de l'eau n'a pas été trop énergique, les hématies, incolores, apparaissent limitées par un fin contour. L'eau a dissous la matière colorante ; il reste le globule privé de son pigment et de ses sels, c'est-à-dire ce qu'on nomme le stroma.

Au point de vue de sa constitution, le globule rouge est en effet composé des deux parties : un stroma albuminoïde (1), une matière colorante cristallisable. De ces deux parties, c'est la seconde, qui est la plus abondante (2). Pour l'étude de la composition chimique du stroma, on se reportera aux traités de chimie biologique. L'étude de l'hémoglobine nous intéresse davantage parce qu'elle comporte une analyse microscopique et qu'elle est inséparable de l'étude des hématies dont elle constitue l'élément le plus important.

Chez quelques invertébrés, on peut trouver l'hémoglobine fixée sur

(1) Substance complexe incolore, insoluble dans l'eau, détruite vers 60°, et dans laquelle on trouve de l'eau, des graisses, de la lécithine, de la cholestérine, des phosphates alcalins, des chlorures alcalins et des substances albuminoïdes parmi lesquelles la globuline du globule, distincte de la globuline du sérum. Pour le mode de préparation des stromas, voir Piettre et Vila, *C. R. Ac. des sc.*, 19 novembre 1906.

(2) Elle forme chez l'homme environ 90 p. 100 du poids sec des hématies.

des cellules rouges, soit dans le sang, soit dans le liquide cœlomique; plus souvent, on la trouve dissoute dans le plasma sanguin. Chez les Vertébrés, le pigment n'est jamais dissous, à l'état normal, ni dans le plasma sanguin, ni dans le liquide cœlomique, chez aucune espèce; mais on le trouve en petite quantité dans les muscles.

Nature de l'hémoglobine. — L'hémoglobine est une substance protéique contenant du fer. C'est la présence de ce fer qui lui donne ses propriétés chimiques caractéristiques.

La présence du fer dans le sang est connue depuis longtemps. Dès la fin du dix-huitième siècle, beaucoup de chimistes attribuaient la couleur rouge du sang au fer, probablement par suite de la couleur rouge des oxydes ferriques. *Berzélius* en 1808, montra que le fer, dans le sang, était uni à une substance organique qui donne à ce liquide sa couleur caractéristique. Ce principe immédiat, qu'on n'avait pas encore isolé à l'état cristallin, appelé par *Berzélius* hématoglobuline, reçut de *Chevreul* en 1827, le nom d'*hématosine*. On le concevait comme une substance albuminoïde contenant du fer en proportions définies, mais beaucoup de chimistes confondaient encore à ce moment le pigment normal des globules rouges avec les produits de sa décomposition. Vers le milieu du dix-neuvième siècle, un certain nombre d'observateurs, en traitant le sang par l'eau et en le laissant se dessécher, aperçurent au microscope des cristaux qui leur parurent de forme assez constante pour une espèce animale donnée (1). La nature véritable de ces cristaux (*hématocristalline*) resta longtemps inconnue jusqu'au jour où *Hoppe-Seyler* (2) montra, par l'analyse spectroscopique, qu'ils constituaient à l'état cristallin, la matière colorante même du sang, à laquelle il donna le nom d'*hémoglobine*. A ce moment, on savait, par des expériences déjà anciennes, que le sérum du sang, séparé de ses globules, est capable de s'emparer d'un peu d'oxygène, quand on l'agite avec ce gaz, mais qu'il en absorbe bien davantage lorsqu'on fait l'expérience avec le sang pur, contenant encore les globules. Il existait donc une relation étroite entre les globules rouges et la respiration, et on se figurait les hématies comme des corps capables de condenser l'oxygène, comme nous savons que peuvent le faire certains corps poreux vis-à-vis des gaz. Mais on ne savait pas que l'oxygène se combine au pigment rouge. *Hoppe-Seyler*, en même temps qu'il déterminait chimiquement cette substance, montra qu'elle a la propriété de former des combinaisons définies avec l'oxygène, avec l'oxyde de carbone, avec le bioxyde d'azote, et que ces combinaisons, de même que les dérivés du pigment, peuvent être caractérisées par le spectroscope (3).

L'hémoglobine peut se présenter sous deux états différents suivant qu'elle contient ou non de l'oxygène : l'hémoglobine oxygénée ou *oxyhémoglobine ;* l'hémoglobine ou *hémoglobine réduite*.

Préparation des cristaux d'hémoglobine. — Pour obtenir des cristaux

(1) Voir Milne-Edwards, *Leçons sur la Physiologie et l'Anatomie comparée*, Paris, 1857, t. I. — A. Hénocque, Les cristaux du sang. *Archives d'Anatomie micr.*, III, 1899-1900.

(2) Hoppe-Seyler, *Virchow's Archiv*, XXIII, 1862 et XXIX, 1864.

(3) Hoppe-Seyler, *Zeitschrift f. physiol. Chemie*, XIII, 1889.

d'hémoglobine (1), il faut s'adresser tout d'abord au sang des animaux dont l'hémoglobine cristallise facilement. Il existe à ce sujet, entre les espèces animales, de très grandes différences : l'hémoglobine du sang de *rat*, de *cobaye* cristallise très facilement. Elle cristallise encore facilement dans le sang du chien, du cheval, de la souris; elle cristallise difficilement dans le sang de l'homme, du porc, du lapin, du mouton, du bœuf, etc. D'une manière générale, plus une hémoglobine est soluble dans l'eau, plus elle cristallise difficilement. L'oxyhémoglobine du rat, du cobaye, de l'écureuil, est peu soluble dans l'eau et cristallise très facilement. Celle du lapin, de l'homme, du singe, du porc, du bœuf est plus soluble et cristallise difficilement. L'oxyhémoglobine du cheval et celle du chien occupent, au point de vue de la solubilité et de l'aptitude à cristalliser, une situation intermédiaire aux deux séries précédentes.

Le cobaye et le rat sont les objets de choix quand on n'a pas besoin de grandes quantités d'oxyhémoglobine. Pour obtenir ces cristaux, il faut que le pigment soit mis en liberté par la destruction spontanée ou provoquée des globules. On peut faire des préparations de sang frais de cobaye ou de rat ; on les abandonne. Par la destruction des globules rouges, des cristaux d'hémoglobine peuvent se produire en petit nombre, spontanément, dans la préparation. Chez le cobaye, ils ont la forme de pyramide, de tétraèdres ; chez le rat, ils apparaissent comme de petits prismes groupés en étoiles. On peut aussi, chez ces animaux, obtenir des cristaux d'oxyhémoglobine en abondance dans des préparations fraîches, non fixées, d'organes riches en hématies (moelle osseuse ou rate).

On peut aussi laisser dessécher sur une lame une goutte de sang de cobaye ou de rat ; lorsque la portion périphérique de la goutte est desséchée, on dépose une goutte d'eau sur la partie centrale et on recouvre d'une lamelle. On obtient de nombreux cristaux.

Les cristaux d'hémoglobine sont assez faciles à obtenir avec le sang veineux splénique : les cristaux peuvent se produire spontanément dans une préparation fraîche de ce sang, chez le cobaye ; on peut aider leur production par la dessiccation ou la congélation. On peut de cette façon obtenir des cristaux avec le sang veineux de la rate sur des cadavres humains (2) ; ils ont la forme de tablettes rhombiques. La congélation de la goutte de sang sur la lame est obtenue facilement avec une petite ampoule de chlorure d'éthyle. On obtient de cette façon, même dans le sang périphérique, des cristaux tétraédriques chez le cobaye et des tables hexagonales chez l'écureuil. L'emploi de l'éther, mélangé directement sur la lame au sang défibriné, est un procédé moins sûr.

On pourra employer la méthode suivante (3) : une goutte de sang de cobaye est déposée sur une lame; lorsqu'elle commence à se dessécher, on l'entoure puis on la recouvre avec du baume de Canada épais. On peut aussi mélanger la goutte de sang au baume sur la lame et recouvrir d'une lamelle. On peut obtenir par ce procédé des cristaux avec du sang de chien, de cheval, etc.

(1) A côté de l'oxyhémoglobine et de l'hémoglobine, Hoppe-Seyler et Kobert distinguent une *artérine* et une *phlébine*, capables également de cristalliser et qui représenteraient les deux états sous lesquels l'hémoglobine est unie chimiquement au stroma. Les cristaux d'artérine et de phlébine répondent simplement aux cristaux d'hémoglobine préparés extemporanément en partant du sang complet, sans élimination des stromas.

(2) H. U. Kobert, *Das Wirbeltierblut in mikrokristallographischer Hinsicht*, Stuttgart, 1901.

(3) Stein, *Centralblatt f. d. med. Wiss.*, XXII, 1884, et *Virchow's Archiv*, XCVII, 1884.

S'il s'agit de sang dont l'hémoglobine cristallise difficilement, le procédé le plus simple est de conserver l'échantillon de sang, défibriné ou non, en tube scellé, à la température du laboratoire ou à 37° (1). Il faut opérer sans précautions aseptiques et au contraire, de telle sorte que des germes de l'air soient mélangés au sang et que celui-ci se putréfie. On laisse le tube contenant le sang ouvert pendant un ou plusieurs jours avant de le sceller. On ne peut suivre la réaction qui exige parfois beaucoup de temps On ouvre les tubes préparés, à différents intervalles. On peut, avec cette méthode, obtenir des cristaux avec le sang des Batraciens. Avec le sang de chien intoxiqué par l'oxyde de carbone, on obtient de longs cristaux prismatiques (2).

La destruction des globules rouges par l'éther, la dessiccation, la décharge électrique, la bile, l'action de la chaleur à 60° (3), etc., permettent aussi d'obtenir des cristaux d'hémoglobine.

Ces cristaux sont très altérables. Pour obtenir des préparations persistantes, on en dessèche une petite quantité sur une lame de verre chauffée et on monte dans le baume; on peut aussi traiter par l'alcool absolu, puis par l'essence de térébenthine et monter dans le baume de Canada.

Les méthodes précédentes, utilisant le sang total et obtenant la cristallisation sans séparation des stromas, sans recristallisation, ne peuvent évidemment être considérées comme donnant des cristaux purs (4). Il faut, pour avoir des cristaux purs, s'adresser à des méthodes plus compliquées dont le principe a été donné par *Hoppe-Seyler* et dans lesquelles l'hémoglobine est soumise à des cristallisations successives (5).

On pourra aussi s'adresser à la méthode de la dialyse. Les globules rouges, lavés dans l'eau salée et sédimentés, sont additionnés de deux fois leur volume d'eau distillée. La solution d'hémoglobine est introduite dans un boyau de parchemin; celui-ci est plongé dans une masse d'alcool à 20-25 p. 100. L'eau dialyse et de nombreux cristaux se déposent sur les parois du sac (6).

L'oxyhémoglobine des Oiseaux peut être préparée par les procédés que nous avons indiqués, mais il est difficile de l'obtenir pure, parce qu'on n'arrive pas à la débarrasser complètement de la nucléine des noyaux. Il en est de même pour le sang des Reptiles et des Batraciens, dont la cristallisation est plus difficile.

Pour avoir des cristaux d'*hémoglobine réduite*, il faut opérer en milieu non oxygéné; il n'existe donc pas de mode de préparation microscopique extemporanée. La plupart des méthodes s'adressent à la putréfaction du sang par des bactéries, à l'abri de l'air.

Mode de formation des cristaux. — Les premiers auteurs qui ont vu les cristaux d'hémoglobine ont admis que ces cristaux pouvaient se former à l'intérieur des globules rouges. Aujourd'hui on sait que, dans l'immense majorité des cas, la

(1) Pasteur, *C. R. Ac. des sciences*, 20 avril 1863. — Gscheidlen, *Pflüger's Archiv der ges. Physiologie*, XVI, 1878.

(2) L'hémoglobine oxycarbonée est moins soluble que l'oxyhémoglobine, de sorte que ses cristaux, dont la forme est semblable, sont plus faciles à obtenir.

(3) Max Schultze, *Archiv f. mikr. Anatomie*, I, 1865.

Wedl (*Virchow's Archiv*, LXXX, 1880) a recommandé l'emploi de l'acide pyrogallique.

(4) Toutes, d'après les idées de Kobert, donnent des cristaux d'artérine et de phlébine.

(5) Pour l'emploi de ces méthodes, voir les *Traités de Physiologie*.

(6) Arthus et Rouchy, *Soc. de Biologie*, 26 octobre 1895 et 22 juillet 1899.

cristallisation est extra-globulaire : l'hémoglobine cristallise dans le plasma où elle a diffusé après la destruction des globules. Cependant, il est certain qu'on voit parfois des globules rouges, isolément, se transformer chacun en un petit groupe de minuscules cristaux qui, au début de leur formation, rappellent, par leur mode de groupement, l'aspect de l'hématie qui leur a donné naissance. Le phénomène est facile à voir dans le sang du rat et dans celui du chien. Mais il ne s'agit pas là, à proprement parler, d'une formation intra-globulaire ; en tout cas, il n'est guère possible d'admettre, avec certains auteurs, qu'un cristal d'hémoglobine puisse apparaître dans un globule et que ce cristal soit susceptible de se redissoudre, le globule gardant sa forme et son intégrité ; la cristallisation entraîne forcément après elle la destruction de l'hématie.

Fig. 118. — Sang de chien conservé *in vitro* depuis vingt-quatre heures. Hématies transformées directement en groupes de minuscules cristaux rhombiques. 750 diam.

Les cristaux peuvent apparaître d'emblée, avec leur aspect définitif comme on le voit chez le cobaye. Le plus souvent ils apparaissent sous forme de fines aiguilles qui s'agglomèrent et s'entre-croisent, se groupent en arborisations régulières de formes très variées ou grossissent par l'adjonction de nouveaux cristaux.

Morphologie des cristaux d'oxyhémoglobine. — Suivant les espèces animales, la forme des cristaux d'oxyhémoglobine varie beaucoup ; mais chez la plupart, cependant, on peut la ramener à un type fondamental : le prisme orthorhombique. Chez le cobaye, les cristaux d'oxyhémoglobine ont généralement la forme de tétraèdres ; chez le rat, ils ont la forme d'octaèdres ou de prismes rhombiques. Chez l'écureuil, l'oxyhémoglobine cristallise en tables hexagonales très caractéristiques ; chez le cheval, elle donne des prismes rhombiques terminés par des faces planes ou quelquefois par des pyramides ; cette dernière forme peut s'observer chez le chien. Chez l'homme, ils ont la forme d'aiguilles rhombiques ou de tables rectangulaires. Ces cristaux, rouges ou jaunâtres, ne sont en général visibles qu'à la loupe et au microscope. Dans des cas plus rares, on les voit facilement à l'œil nu et ils peuvent même atteindre quelques millimètres de long.

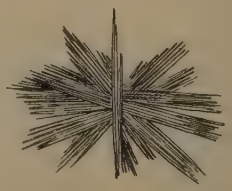


Fig. 119. — Cristaux d'oxyhémoglobine du chien.

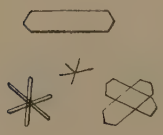


Fig. 120. — Cristaux d'oxyhémoglobine du sang du rat.

Les aspects différents que présentent les cristaux d'oxyhémoglobine suivant les espèces ont fait supposer à quelques auteurs qu'il serait possible de reconnaître l'origine d'un sang d'après

la forme de ces cristaux. Mais ces faits n'ont guère d'application médico-légale. Ce n'est que dans des cas très exceptionnels que la détermination d'un sang pourrait être faite par l'examen de ses cristaux d'hémoglobine. Suivant les circonstances de la cristallisation : nature et quantité du dissolvant, rapidité de la cristallisation, on peut obtenir, pour une même espèce de sang, des formes cristallines différentes. Inversement, avec du sang d'espèces différentes, on pourra quelquefois obtenir des cristaux de même forme.

Fig. 121. — Cristaux d'oxyhémoglobine du sang de l'écureuil. D'après Funke.

Les cristaux d'oxyhémoglobine de l'écureuil et du hamster, en forme de tables hexagonales, seraient seules caractéristiques (1). Mais, après plusieurs recristallisations, l'hémoglobine de l'écureuil pourrait présenter des prismes et des tétraèdres. La forme tétraédrique des cristaux du cobaye n'existe jamais chez l'homme, mais elle peut exister chez d'autres animaux; la présence de ces cristaux tétraédriques permet, à la rigueur, d'affirmer qu'il ne s'agit pas de sang humain, mais elle ne permet pas d'affirmer avec certitude qu'il s'agit de sang de cobaye (2). Il résulte de ces différents faits qu'il n'y a pas lieu d'attacher une grande confiance à la morphologie des cristaux d'hémoglobine pour la détermination du sang.

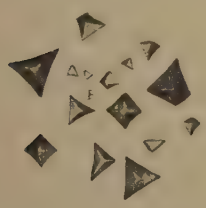


Fig. 122. — Cristaux d'oxyhémoglobine du sang du cobaye. D'après Funke.

La question est encore compliquée par le fait suivant : c'est que, dans certains cas, les cristaux d'oxyhémoglobine peuvent être mélangés de cristaux d'hémoglobine réduite, bien que ces derniers soient plus solubles et, par conséquent, plus difficiles à obtenir. Les cristaux d'hémoglobine réduite ont, en général, la même forme que les cristaux d'oxyhémoglobine correspondants. Mais cette forme, cependant, pourrait varier. Ainsi, chez le cheval,

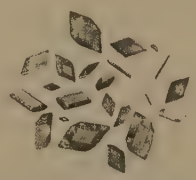


Fig. 123. — Cristaux d'oxyhémoglobine du hamster. D'après Funke.

(1) Stein (*Virchow's Archiv*, CLXII, 1900), en ajoutant au sang des sels neutres, aurait obtenu chez le cobaye, des tables hexagonales à la place de tétraèdres. Hufner aurait obtenu des tables hexagonales avec le sang de cheval (hémoglobine réduite).

(2) Frieboes, *Arch. f. d. ges. Physiol.*, XCVIII, 1903.

Hénocque, *Arch. d'anat. micr.*, III, 1899-1900.

d'après *Hüfner* (1), l'hémoglobine réduite forme des tables hexagonales et l'oxyhémoglobine, des prismes rhombiques ; lorsque, dans la préparation des cristaux d'oxyhémoglobine, on ne prend pas de précautions spéciales pour assurer l'oxygénisation complète du liquide, on obtient un mélange de tables hexagonales (hémoglobine réduite) et de prismes rhombiques (oxyhémoglobine) (2).

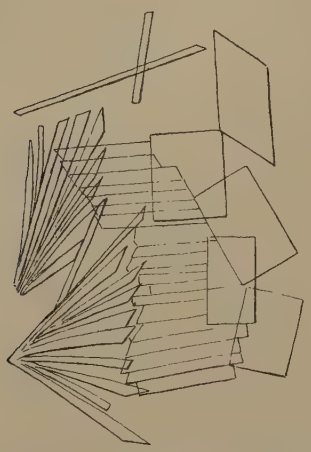


Fig. 124. — Sang d'homme asphyxié. Cristaux d'hémoglobine réduite. Réglettes et tables rhombiques. D'après Hénocque.

Altérations et transformation des cristaux. — Les cristaux d'oxyhémoglobine sont très altérables. Ils sont solubles dans l'eau (3). Lorsqu'on les dessèche, ils conservent leur forme, mais leur couleur vire au rouge brun et ils perdent, par cette dessiccation, leur solubilité dans l'eau distillée. Pour les dissoudre complètement, il faut ajouter à l'eau distillée un alcali, un peu de carbonate de soude ou d'ammoniaque. Plus les cristaux ont été desséchés, plus il faut ajouter d'alcali ; la solution alcaline n'est pas rouge, mais brun foncé (4).

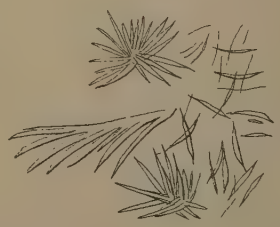


Fig. 125. — Sang d'homme asphyxié. Cristaux d'hémoglobine réduite. D'après Hénocque.

Pour avoir des préparations microscopiques bien persistantes, il faut dessécher,

(1) Cf. Uhlik, *Archiv f. die ges. Phys.*, CIV, 1904.

(2) Le pléomorphisme des cristaux d'oxyhémoglobine a fait penser à quelques auteurs que cette substance était dimorphe. D'autres ont supposé que ces différentes formes correspondaient à des constitutions chimiques différentes ou à des degrés différents d'hydratation. La quantité d'eau de cristallisation varie en effet suivant que l'échantillon examiné provient d'un animal ou d'un autre, mais ces différences se retrouvent aussi pour des échantillons divers de l'oxyhémoglobine du même animal.

(3) Nous avons indiqué plus haut les variations de cette solubilité suivant les espèces et nous avons vu que l'hémoglobine était d'autant plus soluble que son aptitude à cristalliser était moins grande. L'oxyhémoglobine est insoluble dans l'alcool, l'éther, les essences, etc. Pourtant, certaines de ces substances détruisent les hématies et provoquent la diffusion de l'hémoglobine ; mais ce sont là deux propriétés distinctes.

(4) Par formation de méthémoglobine. Il est probable que lorsqu'on examine une préparation de cristaux d'oxyhémoglobine dans laquelle les cristaux sont desséchés depuis longtemps, ce ne sont plus de véritables cristaux d'oxyhémoglobine qu'on a sous les yeux, au microscope. La forme est conservée ; la transformation chimique serait intracristalline (Kobert).

à basse température, sur lame, la bouillie cristalline, jusqu'à ce que les cristaux aient perdu leur reflet brillant. On les recouvre ensuite de baume épais et on met une lamelle. Pour la bonne conservation des cristaux, il faut que leur eau de cristallisation se maintienne exactement. Lorsqu'après des mois et des années, le baume ou la résine dammare ont lentement enlevé aux cristaux, dans les parties périphériques, leur eau de cristallisation, ces cristaux apparaissent au microscope comme fondus sur les bords; leurs pointes sont arrondies. Mais, dans cet état, ils peuvent encore se conserver pendant fort longtemps.

Fig. 126. — Moelle osseuse de cobaye conservée *in vitro* sans réactifs, à 35°, Apparition de cristaux d'hémoglobine. 300 diam.

Dans d'autres cas, on les voit se fendiller suivant les faces de clivage et se transformer en cristaux plus petits et plus minces ; ils peuvent aussi se partager suivant leur petit axe. Enfin, on peut y voir apparaître des vacuoles ; certains se transforment en une substance granuleuse. Dans ceux dont la forme est bien conservée, la réfringence disparaît plus ou moins ; ils ont un aspect trouble, leur coloration devient brunâtre.

Ces altérations morphologiques s'accompagnent de transformations chimiques. La transformation de l'oxyhémoglobine en hémoglobine peut se produire spontanément dans un cristal sans qu'il change de forme; la coloration plus foncée, violacée et les réactions spectroscopiques indiquent seules la transformation, qui est réversible. D'autres cristaux deviennent brunâtres et se transforment en méthémoglobine sans changer de forme. L'aspect cristallin finit par se perdre de plus en plus; la couleur des cristaux devient jaunâtre et brunâtre; on voit apparaître les caractères spectroscopiques de l'hématine, et il se forme en même temps des amas cristalloïdes de mélanine (*Hénocque*). Les cristaux d'hémochromogène, reconnaissables à leur couleur rose carmin et à leur bande caractéristique au spectroscope, persistent plus longtemps.

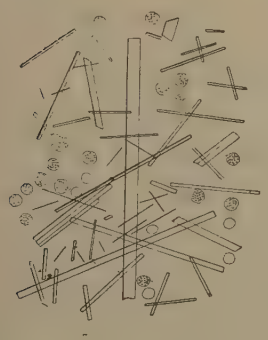


Fig. 127. — Sang de triton conservé en tube scellé depuis 5 mois. Cristaux d'hémoglobine. 200 diam.

A côté des cristaux provenant de l'hémoglobine et de ses dérivés, on trouve dans les préparations des cristaux divers provenant du sang ou introduits dans la préparation par les réactifs employés.

Propriétés optiques des cristaux d'hémoglobine. — La plupart des cristaux d'hémoglobine appartiennent au système orthorhombique (homme, singe, chat, chien, lapin, rat, souris, cheval, mouton, etc.). Quelques-uns, ceux qui se présentent sous forme de tables hexagonales, appartiennent au système rhomboédrique (écureuil, hamster). Les cristaux sphénoïdes du cobaye se rattachent au système orthorhombique.

Tous ces cristaux sont biréfringents. Examinés avec un oculaire polarisant, ils ne présentent pas d'extinction persistante dans la rotation complète, comme les

substances amorphes et les cristaux du système cubique. Lorsque les nicols sont croisés à angle droit de façon que le champ soit obscur, le cristal, dans ces conditions, laisse passer une certaine quantité de lumière et pourra montrer des teintes différentes suivant la position de l'axe du cristal par rapport au plan de polarisation. Ce pleïchromisme appartient surtout aux cristaux d'hémoglobine réduite (1).

Fig. 128. — Cristal d'oxyhémoglobine du cheval. D'après Kobert.

Le spectre d'absorption des cristaux d'hémoglobine est le même que celui de leur solution; seulement, il existe, entre les bandes d'absorption, des écarts plus ou moins grands suivant la position du cristal, le pouvoir dispersif variant naturellement suivant la position de son axe optique.

Propriétés physico-chimiques des solutions d'hémoglobine. — Les solutions aqueuses d'oxyhémoglobine sont parfaitement transparentes et apparaissent avec une teinte qui, suivant l'épaisseur et la concentration, varie du jaune orangé au rouge vif rubis. Les solutions d'hémoglobine réduite, examinées par transparence en couche épaisse, sont d'un rouge foncé ; en couche mince, elles sont vertes à la lumière transmise (2).

L'oxyhémoglobine est dextrogyre. Les combinaisons oxycarbonée et carbonique de l'hémoglobine ont un pouvoir rotatoire identique. Les nucléoprotéides et les nucléines sont également dextrogyres. La globine, matière albuminoïde qui constitue la plus grande partie de l'hémoglobine, est au contraire lévogyre comme les albuminoïdes en général.

Comme la plupart des substances albuminoïdes en solution, l'oxyhémoglobine ne dialyse pas, et cette propriété est même utilisée pour vérifier le fonctionnement d'un dialyseur. L'oxyhémoglobine est partiellement retenue par les filtres de porcelaine dégourdie. Les premières gouttes qui passent sont incolores, puis le filtrat devient rouge. Les solutions d'oxyhémoglobine, traversées par un courant galvanique, déposent des cristaux au pôle positif comme les colloïdes électro-négatifs. Les faits précédents ont permis de penser que, bien que cristallisable, l'oxyhémoglobine dissoute se trouvait en solution colloïdale, c'est-à-dire à l'état d'émulsion ultra fine. Cependant, quelques auteurs admettent encore qu'il s'agit de vraies solutions.

L'alcool absolu, l'éther, le chloroforme, dans lesquelles l'oxyhémoglobine est insoluble, précipitent cette substance de ses solutions aqueuses. La plupart des acides minéraux, même très étendus, précipitent l'oxyhémoglobine et la décomposent. L'oxyhémoglobine est précipitée de ses solutions par le sulfate d'ammonium, l'acétate de potassium, le sulfate de magnésium, etc., et par un grand nombre de sels de métaux lourds, notamment par le sulfate de cuivre, le chlorure et l'acétate de zinc, etc. La connaissance des agents de précipitation de l'hémo-

(1) Les cristaux d'hémoglobine réduite ont en général la même forme que les cristaux d'oxyhémoglobine correspondante. Il en est de même pour les cristaux d'hémoglobine oxycarbonée. On peut obtenir la réduction des cristaux d'oxyhémoglobine si on leur enlève leur oxygène avec la pompe à mercure, Les cristaux d'hémoglobine réduite, encore humides, sont très altérables et se transforment rapidement à l'air en oxyhémoglobine. Ils sont d'un rouge beaucoup plus foncé que les cristaux d'oxyhémoglobine vus dans les mêmes conditions.

(2) Hénocque, *Archives d'an. micr.*, III, 1900.

globine est intéressante parce qu'elle permet peut-être d'expliquer certaines altérations produites sur les globules rouges par les réactifs.

La chaleur détermine, vers 64°, la coagulation des solutions d'oxyhémoglobine ; le pigment est en même temps décomposé en hématine et globine.

Caractères spectroscopiques des solutions d'hémoglobine. — Les solutions d'hémoglobine présentent un spectre d'absorption particulier. L'analyse spectroscopique a une importance fondamentale pour l'étude de l'hémoglobine et de tous ses dérivés. On sait que cette méthode est basée sur le phénomène de la décomposition de la lumière blanche par le prisme en faisceaux de coloration différente qui, en partant du faisceau le plus dévié et en allant vers le moins dévié sont successivement : violet, indigo, bleu, vert, jaune, orangé, rouge. Ce sont les sept principales teintes que distingue notre œil dans le spectre de la lumière solaire ; en réalité, il y a des teintes intermédiaires et le passage de l'une à l'autre est insensible. Si, au lieu de faire arriver sur le prisme la lumière solaire, on projette des faisceaux lumineux provenant de lumières artificielles, on produit aussi un spectre où les teintes seront distribuées de la même façon, mais en général, quelques-unes seront effacées, ou bien leur intensité sera modifiée. La nuance qui domine dans une source artificielle de lumière, dans une flamme par exemple, est aussi celle qui domine dans son spectre : des flammes jaunes, rouges, vertes, etc, donneront chacune un spectre où la nuance dominante sera respectivement le jaune, le rouge, et le vert.

Si, par l'interposition d'une lentille achromatique, on produit un spectre solaire à faisceaux colorés bien séparés, on s'aperçoit que le spectre est sillonné, perpendiculairement à sa longueur, de raies sombres, en général très fines : ce sont les raies de Frauenhofer. Elles sont extrêmement nombreuses ; elles ont des positions absolument fixes ; elles sont donc importantes comme points de repère. On les désigne par des lettres : les principales sont les raies A, B, C dans le rouge, D dans le jaune, E dans le vert, F dans le bleu, G dans l'indigo et H dans le violet. Elles sont dues à l'absorption de certains rayons lumineux par l'atmosphère du soleil.

En interposant entre le prisme et la lumière solaire, des substances en solution, un certain nombre de rayons lumineux seront absorbés et certaines régions du spectre seront éteintes ou sillonnées de bandes obscures. Les spectres produits par une source de lumière naturelle ou artificielle sont dits *spectres d'émission ;* les spectres produits par l'interposition d'une solution colorée à la source lumineuse sont dits *spectres d'absorption*. Les spectres d'émission sont caractéristiques pour beaucoup de corps incandescents ; aussi servent-ils à la détermination d'un grand nombre de substances. Pour les observer, on opère en chambre noire et on porte un fragment de la substance à analyser dans un bec Bunsen. Les métaux donnent des spectres dont la plus grande partie des couleurs est éteinte ; on ne voit que quelques raies brillantes. Le spectre du sodium par exemple est constitué uniquement par une raie brillante dans le jaune correspondant exactement à la raie D de Frauenhofer. Aussi le spectre du sodium est-il utilisé constamment, dans les études spectroscopiques, comme spectre de comparaison pour situer la raie D.

Pour observer les spectres d'absorption, on place le liquide ou la solution colorée à analyser entre le prisme et la source de lumière (lumière du jour ou source

lumineuse bien définie). Les lignes ou bandes noires sont, dans leur ensemble, caractéristiques de la substance interposée. Les raies de Frauenhofer sont, de la même manière, dues à l'absorption de certaines radiations lumineuses par les vapeurs métalliques contenues dans l'atmosphère du soleil : ces vapeurs étant moins chaudes que la source de lumière, produisent un spectre d'absorption. La raie D de Frauenhofer est ainsi une raie noire d'absorption due à la présence du sodium dans l'atmosphère solaire.

On sait aujourd'hui que les radiations simples qui constituent par leur mélange la lumière blanche, sont formées par des ondulations ou vibrations. On suppose que la source lumineuse est le siège d'un mouvement vibratoire et que les vibrations se propagent dans l'éther impondérable, comme les vibrations sonores dans l'air ou comme les ondes formées à la surface d'une eau tranquille par un choc. En partant de l'évaluation de la vitesse de propagation de la lumière, on a pu calculer l'amplitude de ces vibrations qui sont mesurées en *longueurs d'onde* ou μ (le millionième de mètre). Elles sont différentes pour chaque radiation du spectre. Pour le spectre solaire par exemple, et pour les limites perceptibles à notre œil entre les teintes, les longueurs d'onde sont par exemple de 0,397 à 0,424 pour le violet, de 0,424 à 0,455 pour l'indigo et augmentent ainsi d'amplitude jusqu'au rouge (0,647 à 0,723). Il est plus important de connaître les longueurs d'onde correspondant aux principales raies de Frauenhofer qui sont des points de repère fixes et faciles à observer, Elles ont été déterminées avec soin. Ainsi, la raie D et la raie E, entre lesquelles se trouvent les deux bandes d'absorption du spectre de l'oxyhémoglobine, correspondent, la première à 0,589 et la seconde à 0,527.

Spectroscope. — Pour observer les spectres dans de bonnes conditions, on se sert d'une lunette spéciale dans laquelle se trouve enchâssé le prisme disperseur : c'est le spectroscope. Cet instrument se compose essentiellement des parties suivantes : 1° un système dispersif formé par un ou plusieurs prismes; 2° un collimateur, tube métallique portant à son extrémité distale une fente et à son extrémité centrale une lentille. C'est par la fente du collimateur qu'arrivent les faisceaux lumineux incidents que l'on veut analyser. C'est une sorte de diaphragme qui permet de modifier l'étendue du spectre et de le rendre plus net et plus lumineux en le rétrécissant et en concentrant ainsi les rayons. La partie supérieure de la fente du collimateur porte ordinairement un petit prisme à réflexion totale qui renvoie dans l'axe les rayons lumineux d'une flamme auxiliaire. On obtient ainsi un deuxième spectre, superposé au premier et qui sert de spectre de comparaison ; 3° une lunette, de faible grossissement et de champ étendu, dont l'axe optique est dirigé de manière à recevoir les rayons émergeant du prisme. Ces rayons viennent alors former l'image du spectre au foyer de l'objectif. Si le spectre est très étendu, on peut en examiner successivement les différentes parties en déplaçant la lunette dont l'axe optique se meut dans le même plan; 4° un 2e collimateur portant un micromètre à divisions très fines photographiées sur verre. Bien éclairée, l'image du micromètre, réfractée par le prisme, se projette dans le champ de la lunette, au-dessus du spectre d'analyse, entre lui et le spectre de comparaison.

Mode d'emploi du spectroscope. — L'étendue du spectre ayant été réglée, on cherche à en déterminer les différentes parties. Pour l'observateur, les diffé-

rentes parties du spectre se projettent, dans l'instrument, sur les divisions du micromètre ; mais ces divisions sont de simples points de repère qui n'ont aucune relation avec les longueurs d'onde. Pour établir cette relation, on pourrait déterminer la situation des principales lignes de Frauenhofer sur le micromètre ; mais il est beaucoup plus facile de déterminer la situation de certains points du spectre par le spectre d'émission de substances connues. On opère dans l'obscurité, le micromètre bien éclairé par une flamme accessoire ; on place dans la flamme du bec Bunsen un fil de platine trempé dans du chlorure de sodium fondu : on obtient ainsi la raie jaune brillante du sodium correspondant à la raie D dont la longueur d'onde, connue est de 0,589. On amène la division 50 du micromètre en face de cette raie. Laissant le micromètre en place, on détermine la situation de la raie la plus brillante donnée par le spectre d'émission de substances connues :

Celle du	chlorure de Potassium ($\lambda = 0,768$)	se projette	sur 16	du micromètre ;
—	chlorure de lithium ($\lambda = 0,670$)	—	28	—
—	chlorure de thallium ($\lambda = 0,535$)	—	77	—
—	chlorure de rubidium ($\lambda = 0,420$)	—	160	

Prenant alors du papier quadrillé au millimètre, on trace deux droites perpendiculaires parallèles aux deux bords. Sur la ligne horizontale, en abscisses, on porte les divisions du micromètre, chaque millimètre correspondant à une division. Sur la droite verticale, en ordonnées, on inscrit les longueurs d'onde, en prenant par exemple 1 millimètre pour 2 millièmes de μ (0 μ 002), on inscrit de haut en bas 422, 424, 426, etc. On porte sur le quadrillage des points aux intersections suivantes : 16 et 768 — 28 et 670 — 50 et 589 — 71 et 335 — 160 et 420. En les rejoignant, on obtient une courbe qui permet de transformer les divisions du micromètre en longueurs d'onde.

Observation des solutions d'hémoglobine. — Pour observer les caractères spectroscopiques de l'hémoglobine, il n'est pas nécessaire d'opérer avec des solutions pures. Il suffit de diluer quelques gouttes de sang dans de l'eau distillée et d'examiner la solution dans une petite cuve à faces parallèles. Si on observe ainsi, au spectroscope, à la lumière du jour, sous une épaisseur de 1 centimètre, une dilution à 10 p. 100 de sang de mammifère (correspondant à peu près à une solution d'hémoglobine à 12 p. 1 000), on constate que la plupart des rayons lumineux sont absorbés, sauf dans la zone du rouge. Si on dilue progressivement ou si on examine la solution sous une épaisseur moindre, la partie visible du spectre augmente d'étendue : pour une dilution à 5 p. 100 (correspondant environ à une solution d'hémoglobine à 6 p. 1.000), le spectre caractéristique de l'oxyhémoglobine apparaît : large zone lumineuse dans le rouge, deux bandes d'absorption assez rapprochées dans le jaune entre D et E, zone lumineuse dans le vert entre E et F, toute la partie droite du spectre étant absorbée. Pour des dilutions plus grandes, les deux bandes d'absorption du jaune diminuent d'épaisseur et la zone lumineuse de droite s'élargit progressivement vers le bleu et vers le violet. Ces variations du spectre suivant la concentration de la solution sont parfaitement représentées dans le graphique classique de Rollet. A une concentration d'oxyhémoglobine supérieure à 6,5 p. 1.000, les deux bandes sont confondues, et au-dessous de 0,5 p. 1.000 elles cessent d'être visibles.

Des deux bandes d'absorption de l'oxyhémoglobine, la première, celle de

gauche, la plus rapprochée de D, est désignée par la lettre α ; elle est plus étroite et paraît plus foncée ; celle de droite, voisine de E, est désignée par la lettre β ; elle est plus large et moins foncée ; toutefois, les mesures photométriques ont montré que c'était au centre de β que se faisait l'absorption de lumière la plus considérable. Le centre de α correspond environ à $\lambda = 0,575$; le centre de β à $\lambda = 0,535$.

Il existe une 3e bande d'absorption de l'oxyhémoglobine : c'est la bande γ, découverte par *Soret* et étudiée par *d'Arsonval* et par *Gamgee*. Elle n'est pas visible à l'œil nu. Pour l'observer, il faut employer un écran fluorescent ou projeter le

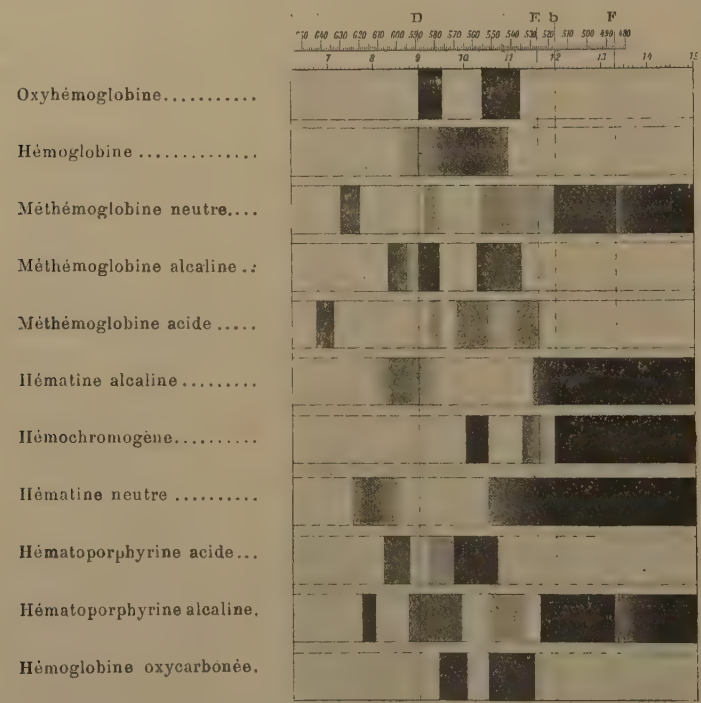


Fig. 129. — Caractères spectroscopiques de l'hémoglobine et de ses principaux dérivés (d'après Ziemke et Müller).

spectre sur un écran fluorescent ou une plaque photographique ; elle est située dans la partie droite du spectre, entre G et *h*. Elle est encore perceptible dans des dilutions très étendues où α et β ont disparu ; elle serait même plus caractéristique que ces deux bandes, qui se voient avec d'autres couleurs : le picrocarminate d'ammoniaque, par exemple, possède un spectre d'absorption semblable à celui de l'oxyhémoglobine.

A la dilution du sang donnant le spectre de l'oxyhémoglobine, ajoutons maintenant quelques gouttes de sulfhydrate d'ammoniaque bien pur, récemment préparé, ou d'une solution alcaline d'hydrosulfite de soude, de tartrate stanneux ou ferreux : l'oxyhémoglobine est réduite et le spectre se modifie. Il présente alors une bande d'absorption unique, très large, à limites un peu estompées, qui occupe à peu près exactement la place des deux bandes de l'oxyhémoglobine et

l'espace qui les sépare (1). Elle occupe environ l'espace DE, qu'elle dépasse à gauche, et surtout à droite vers F, dans les fortes concentrations. La partie droite, obscure du spectre n'est pas sensiblement modifiée. A concentration égale, les solutions d'hémoglobine réduite absorbent une plus grande étendue de l'extrémité rouge et une moins grande étendue de l'extrémité violette que les solutions d'oxyhémoglobine.

L'hémoglobine oxycarbonnée donne un spectre absolument analogue à celui de l'oxyhémoglobine dont le distingue seulement la propriété de n'être pas modifié par les agents réducteurs. Les deux bandes de l'hémoglobine oxycarbonée sont situées un peu plus à droite que celles de l'oxyhémoglobine.

Les solutions d'hémoglobine obtenues avec des cristaux purs ou avec du sang, donnent, au spectroscope, les mêmes résultats (2).

Microspectroscopie. — L'analyse spectroscopique a été appliquée à l'étude microscopique grâce à l'emploi du microspectroscope destiné à obtenir le spectre d'objets visibles seulement au microscope. L'appareil, qui s'adapte au microscope à la place de l'oculaire, est constitué essentiellement par un oculaire faible dont la lentille supérieure est munie d'un diaphragme en forme de fente dont la largeur peut être variée à volonté. Au-dessus est placé un prisme dispersif à vision directe. L'instrument est souvent muni en outre d'un prisme de comparaison ou d'un micromètre.

Le microscope est muni d'un objectif faible et l'oculaire spectroscopique est orienté de telle sorte que la fente soit antéro-postérieure. L'observation peut être faite avec la lumière du jour ou avec la lumière artificielle ; dans ce dernier cas, les raies de Frauenhofer ne sont naturellement pas distinctes.

Le microspectroscope peut être utilisé pour l'étude de solutions d'hémoglobine qu'on renferme dans un petit tube de verre aplati; après avoir bouché le tube on le fixe horizontalement sur la platine du microscope (3). Une couche de sang mince, une membrane vasculaire d'un animal vivant peuvent donner le spectre de l'oxyhémoglobine (4). Mais le microspectroscope est surtout destiné à l'analyse spectroscopique d'objets visibles seulement au microscope, et en particulier à l'étude spectroscopique des cristaux du sang (5). Le cristal ou le groupe de cristaux

(1) C'est la bande de Stokes.

(2) D'après les recherches de *Vila* et *Piettre* (*C. R. Ac. des sc.*, 10 avril 1905 et *Bull. de la Soc. chimique*, XXXIII, 1905), les solutions d'hémoglobines obtenues avec du sang ou avec des cristaux possèdent une bande d'absorption dans le rouge ($\lambda = 634$) qui se déplace à $\lambda = 612$ dans les solutions fluorées et qui apparaît en dehors des conditions dans lesquelles se forme la méthémoglobine. D'après ces recherches, il semble que la matière colorante du sang, dès qu'elle est mise en liberté, n'est plus absolument identique à ce qu'elle est dans le complexe globulaire. Pour les spectres des dérivés de l'hémoglobine, consultez Ziemke et Müller, *Archiv f. Physiologie*, suppl. 1901; Hénocque, *Spectroscopie biologique in Traité de Physique biologique* de d'Arsonval, Gariel, Chauveau, Marey et Weiss, II, Paris, 1903. — V. Henri et Wurmser, *S. de B.*, 22 juin 1912.

(3) On peut aussi se servir de cuves d'épaisseur variable (voir Malassez, *Archives de physiologie*, 1886).

(4) Henocque, *S. de Biologie*, 1er décembre 1900 et *Archives d'an. microsc.*, III, 1899-1900.

(5) Une préparation épaisse de sang frais, bordée à la paraffine, donne au microspectroscope le spectre de l'oxyhémoglobine, et au bout de 24 à 48 heures, le spectre de l'hémoglobine réduite. Le globule rouge des Mammifères, observé à plat, n'est pas assez épais pour donner au microspectroscope, le spectre de l'hémoglobine, mais les deux bandes caractéristiques de l'oxyhémoglobine peuvent être obtenues avec les hématies vues de champ et disposées en piles.

à analyser est repéré à l'aide d'un objectif faible et d'un oculaire ordinaire et placé exactement au centre du champ; on remplace ensuite l'oculaire ordinaire par l'oculaire microspectroscopique. Des dispositifs spéciaux ont été imaginés pour permettre de retrouver les cristaux au microscope sans enlever l'appareil, et en élargissant simplement la fente. On peut repérer de cette façon un cristal de petite taille et en obtenir le spectre. Le microspectroscope peut être remplacé par un spectroscope à vision directe introduit et fixé dans le tube du microscope.

Les cristaux d'hémoglobine et les cristaux de ses dérivés donnent les mêmes spectres que les solutions. Avec les cristaux d'oxyhémoglobine, on observe l'apparition des deux bandes ; mais ce n'est que dans les cristaux ayant une épaisseur assez grande qu'on peut observer la confusion des deux bandes ; on observera plus rarement encore la disparition du vert. Dans l'étude des cristaux d'hémoglobine réduite, on observera, plus ou moins foncée, la bande unique caractéristique.

Composition chimique de l'hémoglobine. — L'analyse de l'hémoglobine montre qu'elle est formée de 6 éléments : C, H, Az, O, S, Fe. Le sang des animaux à globules rouges nucléés, en particulier celui des Oiseaux qui a été surtout étudié, y montre, en plus, de petites quantités de phosphore. Mais il est probable que ce phosphore n'appartient pas à la molécule d'hémoglobine, mais provient des nucléines du noyau.

On considère l'hémoglobine comme constituée par l'union d'une substance colorée (hémochromogène ou hématine) et d'une matière albuminoïde : la globine. Le fer est contenu exclusivement dans le fragment coloré, le soufre dans le second. La très petite proportion de fer trouvée dans les analyses centésimales et la constance remarquable de cette proportion dans les divers échantillons (1) a conduit à penser que la molécule d'hémoglobine ne contenait qu'un atome de fer. En partant de cette hypothèse, on a déduit de l'analyse centésimale une valeur minima de la grandeur moléculaire aboutissant à des formules correspondant à un poids moléculaire extrêmement élevé. Pour le poids moléculaire de l'hémoglobine des Mammifères, les chiffres trouvés varient de 15.000 à 17.000. Il s'agit donc d'édifices moléculaires énormes et les solutions d'hémoglobine ont pu être considérées comme des solutions colloïdales.

L'étude des propriétés spécifiques de l'hémoglobine (caractères spectroscopiques, capacité d'absorption de certains gaz, etc.) la montre toujours semblable à elle-même, ce qui permet de penser que l'hémoglobine des différentes espèces animales est identique. Pourtant, la teneur en soufre varie, ce qui, ajouté aux variations de la forme cristalline, de l'eau de cristallisation, de la solubilité, a conduit certains auteurs à admettre la multiplicité des hémoglobines. Le soufre étant contenu dans le noyau albuminoïde de la molécule, et le fer appartenant au chromogène étant constant, on pourrait supposer qu'il existe en effet, d'une espèce à l'autre, des hémoglobines différentes, dans lesquelles le noyau ferrugineux resterait identique, les variations n'appartenant qu'au noyau albuminoïde. Certains auteurs sont même allés plus loin et ont admis des variations de l'hémoglobine dans la même espèce, et suivant les circonstances ; c'est ainsi que *Bohr* a cherché à montrer que l'on peut obtenir, en partant du sang de chien ou de cheval,

(1) Lapicque et Gillardoni (*Soc. de Biologie*, 12 mai 1900) ont trouvé, pour l'hémoglobine du cheval, 0,30 à 0,34 p. 100.

plusieurs variétés d'oxyhémoglobine, dont les bandes d'absorption occupent la même disposition dans le spectre, mais qui différeraient par la teneur en fer, la quantité d'oxygène combiné, le poids moléculaire, la marche de la dissociation, etc. Mais ces conclusions ne sont généralement pas admises et on pense qu'il s'agit plutôt d'altérations. La question de la multiplicité des hémoglobines, qui a en physiologie et en pathologie un très grand intérêt, ne peut être considérée comme résolue (1).

Dédoublement de l'hémoglobine. — Chauffée vers 70°, ou traitée à la température ordinaire par des acides minéraux ou des bases fortes, l'oxyhémoglobine, en solution aqueuse, se décompose en un protéide coloré contenant tout le fer : l'*hématine*, et une substance albuminoïde incolore : la *globine*. L'hématine ne représente que 6 p. 100 de la molécule d'hémoglobine ; c'est elle pourtant qui en forme la portion importante ; c'est à elle que l'hémoglobine doit ses propriétés fonctionnelles spécifiques. La globine, qui représente 94 p. 100 de la molécule, ne paraît servir que de support au noyau ferrugineux ; c'est un albuminoïde contenant du soufre ; elle a été rapprochée des histones.

Fixation de l'oxygène par l'hémoglobine. Fonction respiratoire. Gaz du sang. — La principale propriété de l'hémoglobine est celle de fixer l'oxygène. Cette réaction est réversible : l'hémoglobine fixe l'oxygène et se transforme en oxyhémoglobine ; l'oxyhémoglobine abandonne facilement son oxygène et se transforme en hémoglobine réduite, et ainsi de suite. Cette réaction constitue la fonction respiratoire de l'hémoglobine.

La fixation de l'oxygène sur l'hémoglobine est réalisée dans l'organisme vivant chez les Vertébrés, au niveau du poumon et de la branchie. Cette fixation peut être aussi réalisée *in vitro*, soit par des globules rouges, soit par des solutions d'hémoglobine. Mais dans l'organisme, les solutions d'hémoglobine ne peuvent jouer le même rôle, et, *in vivo*, l'hémoglobine provenant de la destruction du globule rouge est inapte aux échanges gazeux et n'est plus qu'un pigment étranger destiné à être transformé et éliminé.

Pour faire comprendre la fonction respiratoire de l'hémoglobine, il est nécessaire de fixer en quelques mots les idées sur les gaz du sang. Le sang normal des Mammifères contient de l'azote qui ne joue aucun rôle physiologique, et aussi en très petite quantité : de l'argon, de l'hydrogène, du méthane et de l'oxyde de carbone. Les deux seuls gaz qui jouent un rôle dans les échanges du sang normal sont l'oxygène et l'acide carbonique, qui se trouvent en partie dissous dans le plasma, en partie combinés. Les volumes de ces gaz dans le sang artériel et veineux, varient beaucoup suivant les espèces et les circonstances physiologiques.

(1) Voir Tiffeneau, Hémoglobine, *in* Gilbert et Weinberg, *Traité du sang*, I, 1913, p. 102, et Nolf, Hémoglobine, in *Dict. de physiologie*, de Charles Richet. D'après les recherches de *Piettre et Vila* (*C. R. Ac. des sc.*, 17 juin 1907) sur l'oxyhémoglobine cristallisée du cheval, les variations dans la teneur en oxygène sont en relation avec l'état sous lequel le pigment est utilisé dans les expériences. Les teneurs très inférieures en oxygène indiquées par *Bohr* pour individualiser des oxyhémoglobines différentes sont dues à des artifices de préparation. Il paraît donc difficile de recourir à des distinctions basées sur la capacité d'oxygène pour caractériser des variétés d'oxyhémoglobine, un même poids de matière, cristallisée en présence de ce gaz, pouvant retenir des quantités très différentes suivant l'état de la matière et les conditions extérieures.

Nicloux (1) donne, chez le chien, d'après de nombreuses analyses concordantes faites chez cet animal par divers auteurs, moyenne qui concorde aussi très exactement avec les chiffres d'une analyse du sang de l'homme : pour 100 cc. de sang, dans le sang artériel : 20 cc. d'O et 40 cc. de CO^2, et dans le sang veineux 10 cc. d'O et 50 cc. de CO^2, ces différents volumes de gaz, naturellement ramenés à 0° et à 760 mm.

La portion d'oxygène dissoute dans le plasma est très faible (0 cc. 2 pour 100 cc. de sang, soit 1 p. 100 environ de la quantité totale), elle suit les lois de la solubilité des gaz (2). La portion combinée est de beaucoup la plus importante; elle forme 99 p. 100 environ de tout l'oxygène du sang. Cette portion combinée n'obéit pas aux lois de *Henry* et de *Dalton*, mais elle est pourtant très influencée par la pression. Elle n'est pas proportionnelle à la pression de l'oxygène du milieu extérieur gazeux comme la quantité d'oxygène dissous; elle augmente cependant avec celle-ci, suivant une courbe qui a été bien déterminée. Pour une tension d'oxygène de 78 mm. de mercure environ dans l'atmosphère gazeuse où le sang est agité *in vitro*, l'hémoglobine est presque entièrement à l'état d'oxyhémoglobine dans le globule. En suivant la courbe, des pressions les plus fortes jusqu'au vide, on voit que la dissociation de l'oxyhémoglobine, insensible jusque vers 70 mm., très faible jusque vers 50 mm., est ensuite très rapide et, pour le vide absolu, est complète, c'est-à-dire que le sang ne renferme plus que de l'hémoglobine réduite.

La quantité totale d'oxygène (exprimée en cc. p. 100 cc. de sang) que le sang peut fixer par agitation avec ce gaz, représente ce qu'on nomme la capacité respiratoire du sang (*Gréhant*). Chez le chien, où elle a été surtout déterminée, elle oscille entre 20 et 30.

L'acide carbonique se trouve aussi, dans le sang, à l'état dissous et à l'état combiné. La portion dissoute dans le plasma est aussi la moins considérable; elle suit naturellement les lois de *Henry* et de *Dalton*. La quantité d'acide carbonique combiné ne suit pas ces lois, mais, comme pour l'oxygène combiné, elle augmente avec la tension de CO^2 dans le milieu extérieur gazeux. Une partie de l'acide carbonique combiné est à l'état de carbonate et de bicarbonate de soude dissous dans le plasma ou combiné aux albuminoïdes. La quantité d'acide carbonique combiné contenue dans le globule rouge est un peu plus faible que celle qui est contenue, combinée, dans le plasma : la plus grande partie est fixée sur l'hémoglonine, à l'état d'hémoglobine carbonique. Comme cette combinaison ne modifie pas la fixation de l'oxygène ou de l'oxyde de carbone sur l'hémoglobine, on est conduit à penser que CO^2 est ici fixé sur la globine et non sur le noyau ferrugineux.

(1) Nicloux, Les gaz du sang, *in Traité du sang*, de Gilbert et Weinberg, I, 1913. — Gréhant, *les Gaz du sang*. — Barcroft, *Ergebnisse der Physiologie*, VII, 1908. — J. Tissot, Gaz du sang, *in Traité de physique biologique*, de d'Arsonval, Chauveau, Gariel et Marey, I, 1901. — L.-G. de Saint-Martin, *Recherches expérimentales sur la respiration*, 1893, et *J. de phys. et de path. gén.*, 1900. — Lambling, *Précis de biochimie*. — Morat et Doyon, *Traité de physiologie*, I, Paris 1904. — Gley, *Physiologie*, 5e éd. 1920. — Ch. Bohr, *die Gasarten des Blutes in Handbuch der phys. Methodik* de Tigerstedt. — Fr. Müller, *in Handbuch der bioch. Arbeits methoden* de Abderhalden.

(2) Cette minime quantité d'oxygène dissoute dans le plasma joue cependant un rôle prépondérant dans la respiration, car au niveau des poumons, c'est le plasma qui reçoit l'oxygène, et au niveau des tissus, c'est lui qui cède ce gaz aux cellules. Les globules jouent surtout le rôle de réservoir d'oxygène. Le réservoir se remplit lorsque la tension de l'oxygène dans le plasma augmente ; il se vide quand elle diminue (Lambling, *Biochimie*).

L'affinité de l'hémoglobine en solution pour l'oxygène est très grande, mais toute l'hémoglobine n'est pas transformée; la quantité d'hémoglobine transformée dépend de la tension de l'oxygène dans le milieu gazeux auquel est exposée la solution; la transformation est d'autant plus intense que la tension est plus grande, mais la quantité transformée n'est pas proportionnelle à cette tension. Dans le sang circulant, c'est la tension de l'oxygène du plasma qui détermine la proportion d'hémoglobine réduite et d'oxyhémoglobine; cette tension devient maxima au niveau du poumon. La quantité d'oxygène fixée par un poids donné d'hémoglobine (*capacité d'absorption, capacité respiratoire*) dépend de la tension d'oxygène et de la température.

En faisant l'expérience avec l'hémoglobine de différents mammifères, *Hüfner* à trouvé une capacité d'absorption très semblable. *Saint-Martin* admet au contraire, suivant la provenance des échantillons d'hémoglobine, même entre sujets de même espèce, et même chez le même sujet, des différences de capacité respiratoire : ainsi, la rénovation du sang qui suit la saignée exagérerait cette capacité. Ces résultats se rattachent à la question de l'identité et de la qualité des hémoglobines. Le mode de préparation des cristaux d'oxyhémoglobine aurait une influence sur la capacité d'absorption des solutions. Toute cette importante question de l'unité chimique et fonctionnelle des hémoglobines n'est pas résolue.

L'hémoglobine possède une affinité plus grande encore pour l'oxyde de carbone que pour l'oxygène ; elle forme avec ce gaz l'hémoglobine oxycarbonée impropre à la respiration et qui fait par conséquent de l'oxyde de carbone un dangereux poison. Cette combinaison est plus stable que l'oxyhémoglobine, mais elle peut être facilement dissociée par l'oxygène pur qui déplace le gaz toxique et régénère l'oxyhémoglobine. C'est une réaction réversible obéissant à la loi des masses. Lorsque l'hémoglobine se trouve au contact de mélanges d'oxyde de carbone et d'oxygène en effet, elle se partage entre ces deux gaz dans des proportions déterminées par les pourcentages respectifs de l'oxyde de carbone et de l'oxygène dans le mélange. Pour un mélange donné et non mortel d'oxyde de carbone et d'air respiré, l'oxyde de carbone est fixé par le sang jusqu'à une certaine limite qui ne peut être dépassée. L'oxygène pur est capable à son tour de déplacer l'oxyde de carbone de sa combinaison (1). Ces faits ont des conséquences importantes au point de vue thérapeutique. Le globule touché par l'oxyde de carbone n'est pas définitivement perdu pour la fonction respiratoire et il est prêt à jouer de nouveau son rôle si on le met en présence d'une grande quantité d'oxygène pur (2).

La transformation de l'oxyhémoglobine en hémoglobine peut être produite par les agents réducteurs. Elle peut résulter aussi de phénomènes de dissociation.

La dissociation de l'oxyhémoglobine est la réduction spontanée de cette substance sous l'influence de la tension de l'oxygène contenu dans le milieu extérieur. Cette dissociation ne porte jamais que sur une partie plus ou moins grande de l'oxyhémoglobine du globule; elle augmente au fur et à mesure que la tension de l'oxygène diminue dans le milieu extérieur gazeux; elle acquiert son maximum dans le vide où elle est complète. La dissociation maxima ne peut être obtenue

(1) Nicloux, *J. de Phys. et de Path. gén.*, XVI, 1914. — *Revue d'Hygiène et de Police sanitaire*, XXXVI, 1914.

(2) Nicloux, Presse médicale, 15 mars 1917 et 3 septembre 1921. Chez l'homme et les animaux, la mort survient lorsque les deux tiers (66 p. 100) de l'hémoglobine totale se trouvent à l'état d'hémoglobine oxycarbonée.

qu'avec le sang pur et les solutions : les cristaux d'oxyhémoglobine, secs, soumis à l'action du vide, ne perdent qu'une partie de leur oxygène. A côté de la tension d'oxygène, facteur le plus actif de la dissociation, il existe des facteurs accessoires. L'élévation de la température favorise la dissociation. Dans le sang normal, la dissociation est encore favorisée par l'augmentation de la tension de l'acide carbonique, phénomène qui a été interprété comme un facteur régulateur de la respiration interne.

Dans l'organisme vivant, la réduction de l'oxyhémoglobine est aussi un phénomène de dissociation. Elle est due à la faiblesse de la tension d'oxygène dans les tissus, dans la lymphe, dans le plasma interstitiel ; l'oxygène s'écoule dans le sens des tensions décroissantes. Les agents réducteurs d'origine cellulaire n'interviennent probablement que pour consommer l'oxygène dissocié. La dissociation observée *in vitro* est un phénomène lent ; pourtant, la réduction observée directement au spectroscope, au niveau des capillaires, sur le vivant, est assez rapide ; aussi a-t-on été porté à admettre, en s'appuyant sur d'autres expériences, que le phénomène de dissociation physiologique pouvait être accéléré par des substances catalytiques contenues dans le globule rouge.

Rôle du fer dans la fonction respiratoire de l'hémoglobine. — Lorsqu'on dédouble l'hémoglobine en ses deux constituants : hématine et globine, tout le fer de la molécule se trouve contenu dans l'hématine et seul ce noyau coloré et ferrugineux garde la propriété de fixer l'oxygène. D'autre part, la quantité d'oxygène fixée par le sang et par les solutions d'hémoglobine est proportionnelle à la quantité de fer contenue dans ces liquides. On a donc été conduit à penser que le fer était l'élément spécifique dont dépend la fonction respiratoire de l'hémoglobine. Il est probable que le fer doit ce rôle à sa propriété de fixer l'oxygène et de le convoyer en passant facilement d'une combinaison très oxygénée à une combinaison moins oxygénée et à la facilité avec laquelle il contracte des combinaisons organiques. Cependant, il est nécessaire que le fer, pour jouer ce rôle, soit combiné d'une manière particulière, et des dérivés principaux de l'hémoglobine, comme la méthémoglobine, sont absolument impropres à l'hématose.

L'hémoglobine contient environ 0,40 p. 100 de fer. Le sang de l'homme contenant environ 13 p. 100 d'hémoglobine, on obtient, en chiffres ronds, environ 0,05 de fer pour 100 de sang ou 0,5 pour 1.000. C'est une quantité fort appréciable. En attribuant à la masse totale du sang une valeur de 13 p. 100 du poids du corps, c'est un poids total de 4 à 5 grammes de fer dans le sang de l'organisme humain, indépendamment de celui qui se trouve en réserve dans les organes et dans les tissus.

On a cherché à évaluer la quantité de fer perdue chaque jour par l'organisme en se basant sur la production journalière de bilirubine. L'hémoglobine se détruit dans le foie où elle forme des pigments biliaires, le fer étant mis en liberté et éliminé par les fèces. On admet que la quantité d'hémoglobine détruite en vingt-quatre heures peut atteindre environ 12 grammes, correspondant à peu près à 100 grammes de sang, ce qui correspond à peu près à 4 centigrammes de fer. Si cette perte n'est pas compensée régulièrement par le fer des aliments, le taux d'hémoglobine pourra descendre : c'est ce qu'on voit dans les expériences d'inanition et, dans les expériences où on soumet des animaux à des régimes pauvres en fer ou exempts de fer. Les réserves en fer du foie paraissent jouer ici un rôle insuffisant, car la teneur en fer de cet organe semble assez fixe pendant le

jeûne. C'est surtout avec l'alimentation exclusivement lactée que ces faits sont les plus frappants. Le lait contient extrêmement peu de fer (environ 3 milligrammes par litre), ce qui apporte à l'organisme beaucoup moins que ce qu'il perd. Chez certaines espèces animales, on voit le taux d'hémoglobine baisser ou rester stationnaire pendant la période d'allaitement, à moins que le foie comme cela a été constaté chez le nouveau-né humain, ne possède de véritables réserves utilisées pendant cette période et capables de compenser l'insuffisance de l'apport alimentaire (1).

Le rôle efficace des aliments riches en fer sur la régénération de l'hémoglobine a pu être démontré expérimentalement; nous examinerons cette question à propos de la réparation du sang. Ces aliments efficaces contiennent le fer à l'état organique. Les expériences de *Bunge* ont, en effet, montré que le fer minéral était sans effet notable sur la régénération de l'hémoglobine alors que le fer organique avait une action certaine. L'action thérapeutique du fer minéral, qui ne peut être contestée dans certains cas, a été expliquée par *Bunge* en supposant que ce fer ajouté fixait, dans l'intestin, les produits sulfurés et permettait ainsi au fer alimentaire, laissé intact, d'être absorbé.

État sous lequel se trouve l'oxyhémoglobine dans le globule rouge. — Nous avons vu plus haut que les globules rouges, dans l'organisme vivant, contenaient à la fois de l'oxyhémoglobine et de l'hémoglobine réduite et que la proportion de ces deux pigments variait suivant la tension de l'oxygène dans le plasma. Les deux formes de l'hémoglobine existent aussi bien dans le sang veineux que dans le sang artériel; l'oxyhémoglobine est seulement plus abondante dans le sang artériel.

Dans le globule même, on discute encore la question de savoir sous quel état se trouve l'hémoglobine. *Hoppe-Seyler* la considérait comme unie chimiquement au stroma; il distinguait dans le globule une *artérine* et une *phlébine* (2) donnant respectivement hors de l'hématie l'*oxyhémoglobine* et l'*hémoglobine réduite*. Certaines théories de l'hémolyse, soutenues par *Ehrlich*, *Arrhenius* et leurs élèves s'appuient sur une idée semblable : l'hémolyse est une action chimique qui libère l'hémoglobine de ses combinaisons dans l'hématie. D'autres auteurs pensent,

(1) Voir chap. XVI et DASTRE, article Fer, in *Dict. de physiolog.* de CH. RICHET. — LAPICQUE, *Exposé de titres*, Paris, 1908. — LAMBLING, *Biochimie*, 3e éd. — HUGOUNENQ, *J. de Physiologie*, I, 1899.

(2) Les idées de HOPPE-SEYLER sur l'artérine et la phlébine, combinaisons de l'oxyhémoglobine et de l'hémoglobine avec le stroma, ont été aussi soutenues par KOBERT ses élèves (voir plus haut). Dans les préparations qui contiennet des cristaux d'artérine lorsqu'à la longue, ces cristaux commencent à se détruire, on verrait toujours apparaître un certain nombre de cristaux incolores représentant les substances du stroma unies à l'oxyhémoglobine dans l'artérine. La plupart des auteurs interprètent aujourd'hui ces faits autrement et d'une manière plus simple : les cristaux d'artérine et de phlébine sont des cristaux d'hémoglobine impurs, insuffisamment débarrassés de leurs stromas. Chez les Oiseaux, malgré des cristallisations répétées, on n'arrive pas à obtenir de l'oxyhémoglobine privée du phosphore du stroma. Pour KOSSEL, le phosphore nucléinique serait uni chimiquement à l'hémoglobine. Il aurait obtenu une combinaison cristalline entre les acides nucléiques thymiques et l'oxyhémoglobine du cheval. Dans l'hémoglobine des Oiseaux, il faudrait voir une combinaison de ce genre. D'autres auteurs pensent qu'il n'y a pas combinaison et que le phosphore nucléinique a été simplement entraîné dans les cristaux qui sont capables de s'imprégner de substances contenues dans les eaux-mères.

au contraire, que l'hémoglobine est à l'état libre, en solution sursaturée dans le globule. Il existe une troisième opinion : sans entrer dans une véritable combinaison chimique, l'hémoglobine, dans le globule, ferait partie de complexes colloïdaux. Nous ferons mieux comprendre cette manière de voir, la plus vraisemblable, dans le chapitre IX consacré à l'hémolyse.

RECHERCHE QUALITATIVE DE L'HÉMOGLOBINE

Pour rechercher l'hémoglobine, on peut employer l'analyse spectroscopique : c'est la seule méthode absolument sûre. On peut s'adresser à l'analyse chimique, où l'on cherche à déceler le pigment sanguin par les caractères de ses dérivés. On peut enfin rechercher l'hémoglobine en mettant en évidence ses propriétés peroxydasiques qui, du reste, ne sont nullement spécifiques et ne peuvent, à elles seules, donner une certitude. Dans les recherches importantes, en médecine légale par exemple, on s'adressera aux trois méthodes.

Recherche qualitative par l'analyse spectroscopique. — On peut observer directement le spectre de l'oxyhémoglobine en diluant progressivement le liquide à analyser pour obtenir le degré de dilution le plus favorable à l'examen. Quelquefois, on est obligé de précipiter les pigments dérivés par l'addition d'une quantité juste suffisante d'acétate de plomb neutre ou alcaline qui laisse en solution l'oxyhémoglobine et l'hémoglobine réduite. Après avoir observé et déterminé les deux bandes du spectre, on fait agir un réducteur et on observe la réunion des deux bandes en une seule : cette réaction est très caractéristique. Si on veut pousser plus loin l'analyse, on soumet la solution réduite à l'action de l'oxyde de carbone (avec le gaz d'éclairage) et on cherche à observer la réapparition des deux bandes. Le nouveau spectre, identique au premier, n'est plus modifié par les agents réducteurs. Ces réactions, exactement faites, sont suffisantes. On peut encore, sur une autre portion de l'échantillon soumis à l'analyse, transformer le spectre de l'oxyhémoglobine en celui de la méthémoglobine qui, en liqueur acide, présente une bande caractéristique dans le rouge (voir plus loin). Lorsque l'échantillon est petit, on fait l'examen au microspectroscope. Si l'échantillon est liquide et très peu riche en pigment, on peut précipiter celui-ci par l'acétate de zinc et redissoudre le précipité dans une petite quantité d'ammoniaque; le liquide doit donner le spectre de l'oxyhémoglobine.

Recherche qualitative par la formation des cristaux d'hémine. — Dans un petit mortier de verre, on broie finement à sec la matière à analyser avec un peu de chlorure de sodium pur et on mélange bien. On porte un peu de cette poudre sur la surface d'une lame porte-objet bien propre. On couvre d'une lamelle; on fait passer sous la lamelle une goutte d'acide acétique glacial et on chauffe avec une extrême lenteur, au-dessus d'une plaque chauffante, en tenant la lame avec une pince. Si c'est nécessaire, on fait passer une nouvelle goutte d'acide sous la lamelle. La réaction se produit très facilement. Il ne faut pas introduire d'eau dans la réaction; le mélange du chlorure de sodium sec au

pigment est une méthode plus sûre que celle qui consiste à faire dessécher sur la lame la solution à analyser à laquelle on a ajouté un peu de chlorure de sodium.

Plus la réaction a été faite lentement, plus les cristaux sont gros et caractéristiques. Les cristaux d'hémine ou de chlorhydrate d'hématine, connus encore sous le nom de cristaux de *Teichmann* (1), sont des cristaux microscopiques, en forme de prismes rhombiques (2), assemblés ordinairement en petits amas dans lesquels on les aperçoit entre-croisés; ils sont d'une jolie couleur mordorée. Cette réaction est très caractéristique. Ils donnent le spectre de l'hématine. Ces cristaux sont insolubles dans l'eau. Il est facile de conserver la préparation en la montant dans la glycérine ou dans le baume.

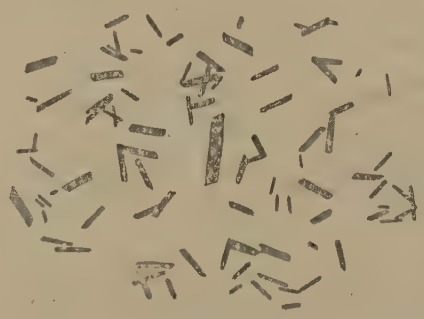


Fig. 130. — Sang d'homme. Cristaux d'hémine réguliers. 750 diam.

Les cristaux de murexide (purpurate d'ammoniaque) ont une forme analogue, mais ils sont d'un rouge vif et ils deviennent violets au contact d'une lessive de potasse. Les cristaux apparus avec des étoffes teintées par l'indigo ont une forme analogue à celle des cristaux d'hémine, mais ils sont bleu foncé. Les cristaux apparus dans le sperme conservé *in vitro* n'ont aucune ressemblance avec les cristaux d'hémine; mais *Florence* (3) a trouvé dans le sperme de l'homme des cristaux spéciaux qui apparaissent en traitant les taches de sperme par une solution iodo-iodurée. Ces cristaux ont un aspect presque identique aux cristaux d'hémine; mais comme ils se produisent dans des conditions toutes spéciales, la confusion ne sera guère possible.

Fig. 131. — Cristaux de Florence. D'après Florence.

Le sang, en nature, contient assez de chlorure de sodium pour la formation des cristaux; mais lorsqu'il s'agit de taches de sang desséché ou de sang dilué, il faut en ajouter (4).

La présence de substances albuminoïdes, produisant des irrégularités de surface du produit d'évaporation de la goutte de sang joue un rôle utile pour favoriser la formation des cristaux d'hémine. Aussi peut-il être parfois nécessaire d'en introduire dans la réaction (5). S'il s'agit d'un sang dilué, on l'additionne d'un peu

(1) Teichmann, *Zeitschrift f. rationelle Medicin*, VIII, 1857.

(2) Ce sont des prismes dont la base est rhombique et dont les arêtes sont inclinées sur la base (Hénocque, *l. c.*). Ils appartiennent au système clinorhombique. Par accolement ils peuvent présenter à leur extrémité, une double facette formant une échancrure à angle rentrant. Ils peuvent aussi apparaître bifides. (Voir Florence, *les Taches de sang en médecine judiciaire*, Th. Lyon, 1885).

(3) Florence, *Du sperme et des taches de sperme en médecine légale*, Paris et Lyon, 1897. On considère aujourd'hui les cristaux de Florence comme formés par la choline ou ses dérivés.

(4) Denigès a recommandé un mélange formé de 5 centimètres cubes d'acide acétique cristallisable et de 0,1 centimètre cube d'une solution à 10 p. 100 de NaCl.

(5) Denigès, *Soc. de pharmacie de Bordeaux* et *Folia hæmatologica*, 1910.

d'eau albumineuse, on dépose une goutte sur la lame de verre et on fait évaporer en chauffant doucement et en évitant que la goutte ne s'étale. Lorsque la goutte est complètement desséchée, on ajoute le chlorure de sodium et l'acide acétique. Lorsqu'il s'agit d'une tache de sang sur une étoffe, on découpe le fragment, on le fait macérer dans l'eau albumineuse, on évapore une goutte de la macération sur lame ; on fait agir le chlorure de sodium et l'acide acétique sur le résidu (1).

Recherche qualitative par transformation de l'hémoglobine en hématine. — On fait bouillir avec la soude le liquide à examiner ; il se forme un précipité rouge sang d'hématine. Cette réaction est assez sensible et elle est utilisée en urologie. Le précipité d'hématine peut donner, comme l'hémoglobine, par l'action de l'acide acétique et du chlorure de sodium, les cristaux caractéristiques d'hémine. L'hématine sera encore caractérisée par son spectre d'absorption en liqueur alcaline, puis acide. On peut encore transformer l'hématine en hémochromogène, dont le spectre, pour une même concentration, est plus intense.

Recherche qualitative de l'hémoglobine par ses propriétés péroxydasiques. — Le sang, comme tous les tissus, décompose directement l'eau oxygénée. En présence de certains peroxydes, comme l'eau oxygénée ou l'essence de térébenthine vieillie, il peut oxyder certains chromogènes comme la teinture de gaïac et donner naissance à des colorations nouvelles. Ces deux réactions, longtemps confondues, sont différentes. La première est d'ordre catalytique ; elle ne libère que de l'oxygène moléculaire peu actif ; elle est due à une diastase qu'on désigne sous le nom de catalase ; elle existe dans tous les tissus, et dans le globule rouge (*Ville et Moitessier*). La seconde est une action peroxydasique ; elle libère de l'oxygène atomique très actif, elle est due à l'oxyhémoglobine du globule rouge (*G. Bertrand, Moitessier*). Le réactif le plus souvent employé est la teinture de gaïac qui, en présence de quelques gouttes d'eau oxygénée ou d'essence de térébenthine vieillie, donne avec les peroxydases, et dans l'espèce, en présence de l'hémoglobine, une coloration bleue très franche.

La teinture de gaïac peut être remplacée par une solution alcoolique de gaïacol : il se produit une coloration rose. Le réactif de Meyer est une solution de phtaléine du phénol dans la lessive de soude qu'on réduit jusqu'à décoloration par ébullition avec de la poudre de zinc. Dans un tube à essai, on introduit 1 cc. de l'échantillon à analyser (liquide en solution), 1 cc. du réactif et 3 gouttes d'eau oxygénée : une belle coloration rouge apparaît. D'autres réactifs ont encore été employés (2).

La réaction des peroxydases est extrêmement sensible et elle est très utilisée

(1) Si le linge souillé de sang a été, avant la recherche, lavé et soumis à l'action de l'eau bouillante, ce qui a pu insolubiliser les albuminoïdes, on peut faire macérer l'étoffe dans quelques gouttes d'ammoniaque au cinquième (Denigès, *l. c.*).

(2) On a employé le pyramidon. Dans un tube à essai, on verse 1 centimètre cube d'une solution alcoolique de pyramidon au dixième, 1 centimètre cube de pyridine et 3 gouttes d'eau oxygénée à 12 volumes, puis on y fait tomber quelques gouttes et jusqu'à 1 centimètre cube du liquide à essayer. Si celui-ci contient des pigments sanguins, il se produit une coloration bleue (Eschaïch, *Soc. de Biologie*, 21 juin 1919). Cette réaction peut être utilisée pour la recherche du sang dans l'urine, les selles et les liquides pathologiques. Elle n'est pas assez caractéristique pour être utilisée en médecine légale. Voir, Pagniez, *Path. med. de Sergent*, X, et Clogne, *J. méd. français*, IX, 1920.

en clinique ; mais elle n'est nullement caractéristique de l'hémoglobine. Elle n'a de valeur absolue que lorsqu'elle est négative ; elle permet alors de conclure à l'absence du pigment sanguin. Mais quand elle est positive, elle n'est qu'une indication ; la détermination de l'hémoglobine ne peut être obtenue que par les méthodes citées plus haut.

Recherche du sang en médecine légale. Marche à suivre dans l'examen d'une tache de sang. — Les méthodes d'analyse qualitative que nous venons d'étudier trouvent leur application dans la recherche du sang en clinique et en médecine légale. Quand le sang est suffisamment bien conservé pour que les globules rouges soient nettement reconnaissables au microscope, la détermination du sang est facile. Mais souvent ils sont détruits. La détermination du sang doit être faite à l'aide de la recherche des cristaux de Teichmann et de l'analyse spectroscopique. La marche à suivre est la suivante. Nous supposerons le cas le plus fréquent, celui d'une tache de sang sur un vêtement. Si la tache présente des croûtelles épaisses, on en enlève quelques parcelles avec la pointe d'un scalpel et on fait la réaction à sec, comme nous l'avons dit plus haut. Si la tache ne présente pas de croûtelles, on la découpe, on porte le fragment sur une lame, on l'imbibe d'eau, et quand la goutte d'eau a absorbé une bonne partie du pigment, on enlève le fragment d'étoffe, on laisse sécher en ayant soin de ne pas laisser étaler la goutte de liquide ; puis on ajoute quelques grains extrêmement fins de chlorure de sodium pulvérisé, on recouvre d'une lamelle, on fait passer une goutte d'acide acétique glacial et on chauffe comme précédemment. On fait des préparations analogues avec les points de l'étoffe non tachés afin d'éliminer la cause d'erreur due aux cristaux d'indigo, assez voisins d'aspect des cristaux d'hémine, et qui pourrait se trouver dans la teinture de l'étoffe.

Un autre échantillon de liquide obtenu par macération d'une tache dans l'eau distillée est examiné au spectroscope. Le spectre de l'hémoglobine est caractéristique ; le spectre du carmin et du picrocarmin, presque identique, n'est pas modifié par les corps réducteurs. Souvent l'hémoglobine, dans les taches anciennes, est modifiée et transformée en hématine dont on recherchera le spectre en solution alcaline et en solution acide. On recherchera surtout le spectre caractéristique de l'hématine réduite en ajoutant un peu de sulfhydrate d'ammoniaque à la solution alcaline obtenue en faisant macérer la tache dans une solution de potasse à 10 p. 100.

Un troisième échantillon est réservé à l'analyse histologique. Les parties périphériques de la tache, les plus minces, sont celles où l'on aura le plus de chance de trouver des globules conservés ; ce sont celles, en effet, où la dessiccation du sang a marché le plus vite. La macération de ces portions sera faite dans une solution de chlorure de sodium à 1 p. 100 à laquelle on ajoutera 1 p. 100 de formol du commerce (1). Cette épreuve permet souvent de reconnaître des globules rouges de mammifères ; elle a parfois permis de reconnaître de gros globules elliptiques et de montrer ainsi qu'il ne s'agissait pas de sang d'homme. En général, la conservation des hématies est insuffisante pour qu'on puisse espérer, par l'étude du diamètre, faire une distinction entre le sang de l'homme et

(1) On pourra employer aussi une solution de potasse caustique à 30 p. 100 ou une solution de sublimé, par exemple : chlorure de sodium, 3 gr., bichlorure de mercure 3,5 gr., eau, 100 gr.

celui des autres mammifères ; on ne pourra, à ce sujet, faire que des suppositions (1).

Une disposition optique spéciale imaginée par *Florence* (2) permet d'examiner directement au microscope les taches de sang sur des corps opaques et en particulier sur des armes. Lorsque les traces de sang sont minimes, les globules peuvent être très bien conservés. On peut les voir à l'aide d'un éclairage spécial qui concentre la lumière directement sur l'objet. L'appareil est constitué essentiellement par un petit prisme à réflexion totale sur lequel on peut diriger un faisceau lumineux ; ce faisceau est réfléchi par le prisme à travers l'objectif jusque sur la surface de l'objet opaque. On regarde avec l'oculaire qui peut être remplacé par un appareil photographique.

DOSAGE DE L'HÉMOGLOBINE

Trois ordres de méthodes permettent de doser l'hémoglobine : méthodes chimiques, méthodes spectroscopiques et spectrophotométriques, méthodes colorimétriques (3).

Méthodes chimiques. — La méthode qui se présente tout naturellement à l'esprit est celle qui consisterait à faire cristalliser l'hémoglobine de l'échantillon du sang et à peser le précipité cristallin obtenu. Mais cette méthode est impraticable parce que toute l'hémoglobine de l'échantillon ne se cristallise pas ; et de plus, les méthodes de cristallisation de l'hémoglobine sont fort délicates. Mais les cristaux d'oxyhémoglobine obtenus à l'état de pureté permettent de faire des solutions de titre exactement connu qui servent de points de comparaison pour les dosages effectués et pour la graduation des instruments. Le résidu cristallin, purifié, desséché, est conservé en solution, en flacon scellé. On titre la solution en prélevant quelques centimètres cubes ; on dessèche à la glacière, on achève la dessiccation et on pèse.

Dosage du fer. — C'est une méthode indirecte. On dose le fer, et pour avoir la teneur en hémoglobine, on multiplie le résultat par un coefficient qui représente le poids de fer en pour cent contenu dans l'hémoglobine (0,42 à 0,43 p. 100). Bien que la proportion de fer soit assez constante, le résultat n'est valable que pour des espèces dont l'hémoglobine a pu être analysée (4).

(1) Voir Vibert, *Médecine légale* et *Archives de physiologie*, 1882 et Florence, Th. Lyon, 1885. La découverte des réactions précipitantes a permis d'ajouter aujourd'hui à ces épreuves celle des précipitines qui, dans certains cas, autorise des suppositions plus précises sur l'origine du sang (voir chap. IX).

(2) Florence, *Bull. des sc. pharmacologiques*, juillet 1907, n° 7, et *Archives d'anthropologie criminelle*, XXII, n° 162, Lyon, 1907.

(3) Lambling, *Des procédés de dosage de l'hémoglobine*, Th. Nancy, 1882. — Burker, *Gewinnung, qualitative und quantitative Bestimmung des Hämoglobins in Handbuch der phys. methodik* de Tigerstedt.

(4) Lambling, *Des procédés de dosage de l'hémoglobine*, Th. Nancy, 1882. — Lapicque, *Sur le dosage du fer dans les recherches physiologiques*, Paris, 1895 ; *Th. sciences*, Paris 1897 et *Exposé de titres*, Paris, 1908. — Jolles, *Wien. klin. Woch*, 1897. — Moreau, Thèse médecine, Lyon, 1901. — Morat et Doyon, *Traité de physiologie*, I, 1904. — Dastre, *fer in Dict. de Phys.* de Ch. Richet,

Capacité respiratoire. — Cette méthode est encore une méthode indirecte. On apprécie le taux d'hémoglobine contenu dans un échantillon de sang, d'après la quantité de gaz que cet échantillon est capable de fixer ou de dégager *in vitro*, dans des conditions déterminées. On peut, soit extraire l'oxygène à la trompe, soit mesurer la quantité d'oxyde de carbone fixé ou dégagé, — soit mesurer l'intensité oxydante de l'oxyhémoglobine vis-à-vis de l'hydrosulfite de soude. Ces méthodes, excellentes entre les mains de physiologistes exercés, sont beaucoup trop longues et trop compliquées pour constituer des méthodes courantes de dosage. Elles exigent aussi de trop grandes quantités de sang. Elles ne peuvent servir que comme termes de comparaison pour la graduation des appareils colorimétriques. Toutefois, il faut bien remarquer que ce sont des méthodes indirectes ; ce qu'elles évaluent, c'est l'intensité du pouvoir respiratoire de l'hémoglobine *in vitro* et non, à proprement parler, la quantité d'hémoglobine contenue dans l'échantillon. Or, d'après *de Saint-Martin*, les variations de la capacité respiratoire ne sont pas absolument proportionnelles aux variations de la quantité d'hémoglobine. La capacité respiratoire n'est absolument constante que pour une même espèce animale, dans des conditions physiologiques données. De plus, la capacité respiratoire peut varier suivant la dilution employée.

Méthodes spectroscopiques. Méthode de Preyer. — Nous avons vu plus haut que pour des concentrations suffisantes (1 p. 100 d'hémoglobine par exemple), les solutions d'oxyhémoglobine absorbaient tous les rayons du spectre, sauf une partie des rayons rouges. Si l'on dilue progressivement la solution, il arrive un moment où quelques rayons verts s'ajouteront aux premiers. Pour une même épaisseur, et toutes conditions égales d'ailleurs, cette apparition du vert correspond à une concentration constante qu'on détermine à l'avance en se servant d'une solution exactement titrée d'oxyhémoglobine. Pour analyser le sang, on remplace la solution d'oxyhémoglobine par une quantité déterminée de sang défibriné ou une dilution forte de sang ; on ajoute graduellement de l'eau distillée jusqu'à apparition du vert ; le volume d'eau employé permet de calculer la richesse du sang en hémoglobine. On peut aussi, au lieu d'étendre la dilution, faire une solution au dixième, constante, et obtenir l'apparition du vert en diminuant progressivement l'épaisseur (*Quincke*). La méthode de Preyer a rendu des services, mais elle est beaucoup moins précise que la spectrophotométrie et elle n'est plus guère employée.

Méthode de Hénocque. — Cette méthode repose sur la recherche d'un indice dont l'appréciation est encore plus sujette à erreurs. L'hématospectroscope de Hénocque se compose : 1° d'un hématoscope, instrument formé de deux lames de verre limitant un espace prismatique capillaire dans lequel on introduit le sang en nature ; 2° d'un spectroscope à vision directe. L'hématoscope est placé devant la fente du spectroscope qu'on déplace progressivement de façon à observer le sang en couche plus ou moins épaisse. On cherche à obtenir les deux bandes de l'oxyhémoglobine égales en largeur et séparées par une bande claire de même largeur. Cet aspect correspond, pour un sang contenant 14 p. 100 d'oxyhémoglobine, à une épaisseur de 70 μ. En diluant ce sang, on obtient la richesse en hémoglobine correspondant aux différentes épaisseurs, et l'appareil est gradué de cette façon. Ce procédé est peu précis et peu sûr.

Spectrophotométrie. — Cette importante méthode est le procédé le plus sûr et le plus précis du dosage de l'hémoglobine. C'est une méthode de laboratoire, qui n'est guère applicable à la clinique, mais c'est à elle qu'il faut s'adresser chaque fois que l'on veut obtenir des résultats très précis, pour certaines recherches physiologiques, par exemple; elle constitue, en tout cas, une excellente méthode de contrôle. Elle est indispensable chaque fois qu'il s'agit de doser l'hémoglobine en présence d'autres pigments (méthémoglobine, etc.).

La méthode consiste essentiellement à mesurer la diminution d'intensité que subit un faisceau lumineux par suite de son passage à travers une solution colorée et à déduire de la valeur de cet affaiblissement la concentration de la solution. La loi qui relie l'absorption de la lumière par les solutions colorées à la concentration de ces solutions ne s'applique qu'à une lumière homogène. Il faut donc décomposer la lumière par le prisme et mesurer l'affaiblissement produit par la solution colorée sur une région précise du spectre.

Si l'on fait varier, soit la concentration, soit l'épaisseur d'une solution d'oxyhémoglobine, les bandes d'absorption varient d'intensité et d'étendue. Plus la solution est concentrée et plus la couche traversée par les rayons incidents est épaisse, plus il y a absorption de lumière, plus les bandes sont foncées et étendues. Si l'épaisseur ne varie pas et si seule la concentration varie, on aura là un moyen d'apprécier le degré de concentration (1). On étudiera donc une même région du spectre dans deux conditions successives : la lumière traversant le dissolvant pur — la lumière traversant la solution. On cherche à apprécier, par la *photométrie*, c'est-à-dire par la mesure de l'intensité lumineuse, la quantité de lumière absorbée par la solution pour la région du spectre examinée et on en déduit le degré de concentration de la solution analysée.

Tout spectrophotomètre comprend trois parties essentielles : 1° un système dispersif, spectroscope capable de donner, l'un au-dessus de l'autre, deux spectres, l'un provenant du dissolvant, l'autre de la solution ; 2° un dispositif permettant d'isoler, pour chaque spectre, la même région à comparer ; 3° un dispositif permettant d'atténuer le faisceau lumineux qui traverse le dissolvant seul, afin d'amener l'intensité du spectre qu'il donne à égalité avec celui du spectre formé par le faisceau qui traverse la dissolution. Suivant les spectrophotomètres, l'atténuation du faisceau lumineux est réalisée soit par variations de distance de la source lumineuse, comme dans le plus grand nombre des mesures photométriques, soit par la polarisation, soit en faisant varier la largeur des fentes par lesquelles arrivent les faisceaux lumineux sur le prisme dispersif.

Les principes de la spectrophotométrie, découverts par *Bunsen* et par *Vierordt*

(1) L'affaiblissement que subit le rayon lumineux par son passage à travers la solution colorée varie naturellement avec l'épaisseur et avec la concentration de la solution. Une épaisseur de liquide double produit le même effet absorbant qu'une solution de concentration double observée sous une épaisseur deux fois moindre. Mais la quantité de lumière absorbée ne croît pas proportionnellement à l'épaisseur et à la concentration; la relation est plus complexe. Pour ces relations, Cf. Lambling, des procédés de dosage de l'hémoglobine, Th. Nancy, 1882, et *Archives de Physiologie*, 1888. — Cf. aussi pour la technique de la spectrophotométrie : Saint-Martin, *Dosage de l'hémoglobine au moyen du spectrophotomètre*, Paris, 1898 ; — Hénocque, A. Broca, in *Traité de Physique biologique* de d'Arsonval, Gariel, Chauveau, Marey, Weiss, Paris, 1903. — Bürker, in *Handbuch der phys. Methodik* de Tigerstedt. — Biehringer, in *Handbuch der bioch. Arbeitsmethoden* de Abderhalden.

ont été appliqués par *Vierordt*, *Hüfner*, *Lambling* et *de Saint-Martin* à l'étude de l'hémoglobine.

Le spectrophotomètre de *Govi* a été l'un des premiers réalisés. Il est basé sur la loi fondamentale de la *photométrie :* les intensités lumineuses varient en raison inverse du carré de la distance. Il est formé par un spectroscope ordinaire, dont la fente est munie de deux prismes rectangulaires à réflexion totale, placés l'un au-dessus de l'autre, et éclairant, l'un, la moitié supérieure, l'autre, la moitié inférieure de la fente. Les sources lumineuses sont placées sur une ligne perpendiculaire à l'axe optique du collimateur. On étudiera successivement diverses régions du spectre qu'on isole à l'aide d'une fente spéciale mobile de la lunette ; et, pour une même région, on égalisera l'éclat des deux spectres superposés, en déplaçant le spectroscope suivant la ligne réunissant les deux sources lumineuses, le long du banc d'optique. C'est la grandeur des déplacements du spectroscope qui expriment la mesure photométrique et, par suite, le degré de concentration de la solution examinée.

Dans le spectrophotomètre de *Vierordt*, l'atténuation est obtenue en faisant varier la largeur de la fente du collimateur. Ce mode d'atténuation est moins recommandable, parce qu'on obtient des spectres de moins en moins purs à mesure que la fente s'élargit.

Dans d'autres spectrophotomètres (*Crova*, *Hüfner*), l'égalisation des intensités lumineuses est obtenue par la polarisation. La lumière à étudier, qui dans l'espèce, traverse la solution d'hémoglobine, éclaire directement le bas de la fente du spectroscope. La lumière qui donne le spectre de comparaison est polarisée avant d'être dispersée. En tournant un des nicols, on augmente ou on diminue l'éclat du spectre étalon ; l'angle de rotation mesure l'intensité lumineuse du spectre de la solution et, par suite, la concentration de celle-ci.

Il existe un quatrième mode d'atténuation qui utilise la propriété qu'ont les lentilles de se laisser traverser par une quantité de lumière proportionnelle à la surface éclairée.

La spectrophotométrie est une méthode extrêmement rigoureuse ; mais son exactitude est limitée, comme pour toutes les méthodes photométriques, par la sensibilité de notre œil, qui ne peut apprécier l'égalité d'éclairement de deux surfaces contiguës que jusqu'à une certaine limite. Mais ici, l'approximation est beaucoup plus grande que celle que donnent les colorimètres. De plus, la spectrophotométrie permet de doser simultanément dans le même liquide plusieurs substances colorantes, si on connaît à l'avance, pour l'instrument employé, leurs rapports d'absorption. On s'adressera donc à cette méthode chaque fois qu'on voudra obtenir des renseignements de très grande précision ou chaque fois qu'il sera nécessaire de doser l'oxyhémoglobine par exemple, en présence d'un autre pigment : hémoglobine réduite, méthémoglobine, hémoglobine oxycarbonée, etc.

Méthodes colorimétriques. — Les méthodes colorimétriques, simples et rapides, sont les plus employées. Avec de bons appareils, entre les mains d'observateurs exercés, elles donnent des résultats constants et d'une approximation très suffisante. Bien que moins précises que la spectrophotométrie, elles suffisent à la plupart des recherches expérimentales. Ce sont les seules utilisables en clinique. Elles reposent sur ce principe : si deux solutions d'un même corps coloré, examinées dans les mêmes conditions d'éclairage et sous une même épaisseur, présentent la même intensité de coloration, leur richesse en matière colorante est

la même. Si le poids d'hémoglobine est connu dans une solution témoin et inconnu dans l'autre, et si, pour obtenir la même teinte, il est nécessaire de modifier l'épaisseur de l'échantillon à analyser, plus l'épaisseur aura été augmentée, plus cette solution sera pauvre en pigment. Autrement dit, les concentrations sont inversement proportionnelles aux épaisseurs, toutes les autres conditions étant égales. On peut aussi ne pas modifier l'épaisseur et diluer progressivement la solution à analyser jusqu'à égalisation des teintes ; les concentrations étant en raison inverse de la dilution, le résultat sera donné par la quantité d'eau ajoutée.

Dans la plupart des méthodes de dosage colorimétrique, l'hémoglobine est dosée à l'état *d'oxyhémoglobine;* dans d'autres, on transforme d'abord l'hémoglobine en hématine, en méthémoglobine ou même en hémoglobine oxycarbonée et ce sont ces dérivés qu'on examine. Les méthodes varient par le dispositif, par la nature de l'étalon choisi et par la notation.

Dispositif. — On peut opérer de plusieurs façons. On peut diluer le sang à examiner jusqu'à ce qu'on soit arrivé à reproduire la teinte type dont on a déterminé d'avance la richesse en hémoglobine (procédés à étalon fixe). On peut étendre le sang d'une quantité d'eau toujours la même et chercher la teinte identique dans une série d'étalons colorés correspondant à des richesses connues (procédés à étalon variable). Mais, au lieu de diluer progressivement le sang, ou de choisir dans une série de teintes, on pourra chercher à faire varier simplement l'épaisseur de la solution de sang ou l'épaisseur de l'étalon coloré, comme dans les colorimètres de Malassez

Nature de l'étalon choisi. — On a renoncé aux solutions titrées d'oxyhémoglobine employées par les premiers auteurs, parce qu'elles se conservent très difficilement. *Hoppe-Seyler* a recommandé l'emploi de solutions d'hémoglobine oxycarbonée ou d'hématine qui se conservent plus longtemps ; mais il faut alors transformer toute l'oxyhémoglobine en carboxyhémoglobine ou en hématine, et c'est une complication. On peut se servir aussi d'une échelle de teintes peintes à l'aquarelle sur papier. Les solutions de picrocarmin introduites dans la technique par *Rajewsky* et par *Malassez* ont remplacé avantageusement les solutions d'oxyhémoglobine dont elles prennent la couleur et même le spectre et elles se conservent très longtemps ; on utilise encore aujourd'hui les solutions glycérinées ou les gelées glycérinées et phéniquées. Toutefois, les seuls étalons absolument inaltérables sont les étalons en verre coloré. On les emploie comme étalons fixes, ou bien. en leur donnant la forme de prismes, on peut les examiner sous des épaisseurs variables ; on détermine leur valeur en hémoglobine au moyen de solutions d'oxyhémoglobine exactement titrées ou au moyen de dilutions sanguines dont la richesse a été appréciée par la capacité respiratoire. Enfin, si l'on veut seulement apprécier les variations relatives du sang d'une même espèce, sans connaître la richesse en valeur absolue d'hémoglobine, on peut se servir d'une dilution de sang faite extemporanément et servant de solutions de comparaison.

Mode de notation. — *a)* Certains appareils donnent le poids d'hémoglobine exprimé en grammes pour 100 cc. de sang. C'est la seule notation rationnelle.

b) D'autres rapportent la quantité d'hémoglobine à la teinte d'un sang considéré comme normal et auquel on donne une valeur arbitraire de 100. Les quantités d'hémoglobine sont exprimées en pour cent de cette valeur. Si par exemple, le sang à examiner, dilué à 1 p. 100, donne, sous la même épaisseur, une teinte identique au sang

témoin dilué à 1 p. 200 (ou dilué à 1 p. 100 et vu sous une épaisseur moitié moindre), on dira que le premier contient 50 p. 100 d'hémoglobine, ce qui veut dire tout simplement qu'il contient moitié moins d'hémoglobine que le témoin. Cette notation a, en effet, un inconvénient, c'est qu'elle ne donne que des valeurs relatives ; elle n'est utilisable que dans des limites étroites, même pour une espèce animale déterminée car, chez l'homme par exemple, à l'état physiologique, la quantité d'hémoglobine varie de 12 gr. a 14 gr. p. 100 cc. de sang suivant les individus. Par comparaison avec des solutions titrées d'hémoglobine ou avec un colorimètre exactement gradué en poids, on peut connaître une fois pour toutes la valeur de 100 et transformer le résultat en chiffres absolus par un calcul très simple.

Ce mode de notation donne cependant des résultats constants et suffisants dans certains cas particuliers, par exemple dans les recherches expérimentales faites avec le même sang, pour les dosages d'hémoglobine dans les expériences d'hémolyse; car, ce qu'il importe d'apprécier ici, ce n'est pas le chiffre absolu d'hémoglobine contenu dans les solutions, mais la grandeur de l'hémolyse dans des solutions faites avec un sang déterminé qui, non hémolysé, sert de témoin.

c) Un troisième mode de notation consiste à rapporter la teinte de l'échantillon à analyser à la teinte d'un sang dit normal qu'on exprime en nombre de globules rouges normaux (*Welcker*, *Hayem*) ; c'est ce que *Hayem* appelle *richesse globulaire*. Ce mode de notation n'échappe pas aux critiques contenues dans le paragraphe précédent ; mais il est plus défectueux, car il n'existe, pour la même espèce, ni chiffre normal de globules rouges, ni charge normale des globules rouges en hémoglobine.

Colorimètre de Dubosq et Laurent. Procédé de Jolyet et Laffont. Colorimètre de Malassez. — Le colorimètre de Dubosq et Laurent est un colorimètre d'usage général qui sert à comparer deux solutions colorées d'intensité différente ; si l'on connaît le titre de la solution témoin en matière colorante, il est facile de trouver la richesse de l'échantillon. Dans les recherches expérimentales sur l'hémolyse, il peut rendre des services. Comme solution de comparaison, on emploie une solution à 1 p. 100 du sang expérimenté et on évalue en pour cent de la solution témoin la grandeur de l'hémolyse (voir ch. IX). Le colorimètre de Dubosq et Laurent a été appliqué par Jolyet et Laffont au dosage de l'hémoglobine par l'adaptation d'un étalon en verre coloré correspondant à une solution de titre connu (1).

Le colorimètre de *Malassez* (2) est imité du colorimètre de Dubosq et Laurent ; mais il a été réduit de volume pour permettre d'employer beaucoup moins de sang et appliqué au dosage rapide de l'hémoglobine par diverses dispositions : pipette spéciale permettant d'utiliser de très petites quantités de sang, étalon fixe en verre coloré, graduation permettant de lire directement le poids d'hémoglobine. C'est un instrument excellent, parfaitement adapté aux recherches cliniques et expérimentales. Il comprend les parties suivantes :

1° Un verre coloré V, étalon fixe, déterminé, assujetti à l'extrémité inférieure d'un tube métallique T.

(1) Jolyet et Laffont, *S. de Biologie*, 24 mars 1877.
(2) Malassez, *Archives de physiologie*, 1882 et 1886.

2° Un deuxième tube de mêmes dimensions, T′, fermé à son extrémité inférieure par une glace transparente V′.

3° une boîte à prismes P, à la partie inférieure de laquelle sont fixés les deux tubes V et V′. et qui porte, à sa partie supérieure, un oculaire dont le champ est divisé, comme dans les polarimètres, en deux parties égales. La disposition des prismes est telle que les rayons lumineux venus à travers l'étalon en verre coloré et ceux qui ont traversé la glace transparente occupent respectivement une des moitiés du champ de l'oculaire comme l'indique la figure.

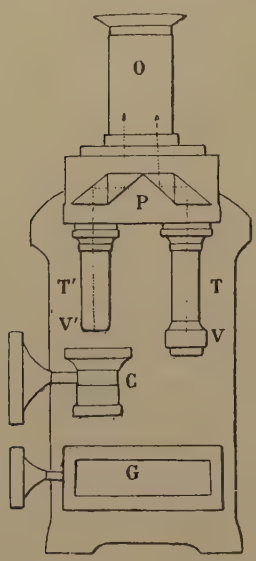


Fig. 132. — Marche des rayons lumineux dans l'hémochromomètre de Malassez.

T, tube métallique formé en bas par l'étalon en verre coloré *V*; — *T′*, tube métallique fermé en bas par une glace transparente *V′*; — *P*, boîte à prismes; — *O*, oculaire; — *C*, cuve dans laquelle est versée la solution sanguine; *G*, glace dépolie.

4° Une petite cuve cylindrique, fermée à sa face inférieure par un verre transparent et qui est destinée à recevoir la solution de sang. L'intérieur de la cuve s'applique exactement sur le tube T′; la cuve, portée par une crémaillère actionnée par un bouton peut se déplacer dans le sens vertical; en remontant, le tube T′ y pénètre plus ou moins comme un piston, de telle sorte que la couche de liquide contenue dans la cuve peut être examinée sous des épaisseurs variables;

5° Une glace dépolie G montée sur un axe horizontal et destinée à réfléchir la lumière du jour.

La teinte de l'étalon coloré correspond à une dilution à 1 p. 100, dans l'eau distillée, d'un sang contenant 5 grammes d'hémoglobine pour 100 cc. et examinée par transparence sous une épaisseur de 5 mm. Cette teinte a été établie au moyen de solutions de sang de chien dont l'hémoglobine a été dosée par l'évaluation de la capacité respiratoire.

La pièce qui supporte la cuve et que l'on met en mouvement pour faire varier les épaisseurs de la dilution sanguine agit en même temps sur un pignon portant un index. Cet index se déplace, au dos de l'appareil, devant une échelle divisée de 5 à 25. Ces divisions, pour une dilution à 1 p. 100, expriment directement en grammes les poids d'hémoglobine contenus dans 100 cc. de sang. La graduation a été obtenue de la façon suivante: Si le sang à analyser, dilué à 1 p. 100, et examiné sous une épaisseur de 5 mm., donne la même teinte que l'étalon, c'est qu'il contient la même quantité d'oxyhémoglobine, soit 5 grammes pour 100 cc. Si l'égalisation de teinte est obtenue sous une épaisseur moitié moindre, de 2 mm. 5, c'est que le sang contient 2 fois plus d'hémoglobine, soit 10 gr. pour 100 cc.

Si le même résultat est obtenu pour une épaisseur de 1 mm. 25, c'est que le sang contient 4 fois plus d'hémoglobine, soit 20 gr. pour 100 cc.. On a donc introduit successivement dans la cuve de petits disques métalliques dont l'épaisseur, très exactement déterminée, est de 5 mm., de 2 mm. 5, de 1 mm. 25 et relevant chaque fois la cuve à fond, on inscrit en face de l'index, pour chacune de ces positions, les poids d'hémoglobine correspondants, soit 5, 10, 20 (pour une dilu-

tion à 1 p. 100); on obtient facilement les chiffres intermédiaires. Ce procédé, employé pour graduer l'appareil, peut être aussi utilisé pour vérifier la graduation. La vérification de l'étalon coloré pourra être faite par comparaison avec un étalon déjà connu ou à l'aide de solutions exactement titrées d'oxyhémoglobine. Les étalons de verre coloré peuvent être considérés comme inaltérables. Le verre coloré, et il en est de même pour les autres étalons, ne reproduit pas toujours exactement la qualité de teinte de la solution sanguine, qualité qui peut varier légèrement; mais il peut toujours en reproduire la valeur, l'intensité.

Mode d'emploi du colorimètre de Malassez. — La dilution de sang est faite avec de l'eau distillée, à l'aide d'une pipette spéciale qui permet de n'employer qu'une goutte de sang. Cette pipette ressemble au mélangeur Potain, mais le réservoir ne contient pas de bille aspiratrice, puisqu'il s'agit ici d'une *solution ;* de plus, la graduation est différente. Le tube capillaire porte les chiffres 1 et 2, permettant de faire des solutions à 1 p. 100 et à 2 p. 100, et le trait d'affleurement au-dessus du réservoir est marqué 100 et non plus 101, puisque tout le liquide doit être rejeté dans la cuve. La prise de sang se fait exactement dans les mêmes conditions que pour la numération; la pipette est tenue comme le mélangeur; elle exige seulement une goutte de sang un peu plus grosse. S'il s'agit de l'homme, la piqûre étant faite au dos du doigt, on recueille donc la première goutte pour le dosage colorimétrique et les gouttes suivantes pour la numération et les préparations sur lames. La pointe de la pipette doit plonger dans la goutte de sang afin que la colonne sanguine ne soit pas coupée par des bulles d'air; on aspire le sang jusqu'au trait 1 ou jusqu'au trait 2 suivant le titre de la solution qu'on veut faire. Essuyant rapidement la pointe de l'instrument sur un linge propre, on la plonge dans un flacon contenant de l'eau distillée, et on aspire jusqu'à ce que la solution affleure le trait 100. Essuyant encore le pointe de l'instrument, on rejette tout le liquide dans la cuve. L'expérience montre que la plus grande sensibilité de l'appareil se trouve entre les chiffres 8 et 15. C'est entre ces limites qu'oscilleront le plus souvent les quantités d'hémoglobine trouvées; on fera donc presque toujours la solution à 1 p. 100. Mais si le sang, comme il arrive à l'état pathologique, contient une quantité d'hémoglobine plus faible, ce qu'on apprécie assez bien avec l'habitude, au seul aspect de la gouttelette, on fait une solution à 2 p. 100, et on divise par 2 le résultat obtenu. Il peut même arriver, à la suite des hémorragies spontanées ou expérimentales, dans certaines anémies graves, dans les leucémies, qu'il soit utile de faire des dilutions plus concentrées: on aspire alors le sang jusqu'à 2, puis, laissant passer une très petite bulle d'air, on aspire une deuxième colonne de sang jusqu'à 2, puis l'eau distillée jusqu'à 100 ; on obtient ainsi un mélange à 1 p. 25 ; une quantité d'hémoglobine de 2 gr. pour 100 cc. de sang, impossible à apprécier exactement à l'œil avec une solution à 1 p. 100, donnera une teinte correspondant au chiffre 8 de l'appareil ; on divise par 4 le résultat obtenu.

La solution étant faite, on la verse entièrement dans la cuve bien propre en soufflant dans le tube de caoutchouc adapté à la pipette. Il est bon d'aspirer et de rejeter plusieurs fois la dilution, afin qu'il ne reste aucune trace de pigment sanguin dans la pipette. La cuve remplie est placée sur son support mobile.

Pour faire la lecture, on place l'appareil sur la table de travail, à une certaine distance d'une fenêtre, et l'on reçoit sur le miroir dépoli la lumière d'un nuage blanc ou d'un mur. Il ne faut pas un éclairage trop vif ; on peut l'adoucir par l'interpo-

sition d'un verre dépoli. Il est nécessaire que la vue de l'observateur soit protégée de la lumière directe par un écran.

Par de petits mouvements alternatifs qui font remonter ou descendre la cuve et varier par conséquent la teinte dans la partie droite de l'oculaire, on cherche à égaliser les deux teintes ; il faut s'attacher surtout à l'intensité de teinte, plus encore qu'à la qualité de ton, les différents sangs pouvant présenter de très légères différences dans la qualité de la teinte qui tire plus ou moins sur le jaune ou sur le rouge. Il faut procéder par de légers mouvements brusques afin que l'œil perçoive bien les changements ; enfin, il faut obtenir le résultat rapidement, sans quoi l'œil se fatigue et ne perçoit plus les différences. Il est bon de faire 2 ou 3 lectures, séparées par un intervalle de repos de 20 ou 30 secondes et de prendra la moyenne. Avec l'habitude, on arrive à une approximation de 1/4 de degré ; en tous cas, il est facile d'obtenir une approximation de 1/2 degré, ce qui est suffisant.

La méthode comporte peu de causes d'erreurs, si l'étalon est exact et l'appareil bien gradué. La capacité de la pipette sera vérifiée par pesées comme nous l'avons indiqué pour le mélangeur Potain.

Il existe plusieurs autres modèles de colorimètres Malassez. L'un présente une disposition analogue à celle que nous avons décrite, mais l'appareil a été simplifié par la suppression de la boîte à prismes et de l'oculaire. Les deux tubes, l'un portant l'étalon de verre coloré, l'autre plongeant dans la solution de sang, sont simplement rapprochés l'un de l'autre et s'ouvrent au milieu d'une plaque noircie horizontale sur le pourtour de laquelle se meut l'index du curseur donnant les quantités d'hémoglobine correspondant à chaque position de la cuve.

Dans un autre modèle, la solution de sang reste fixe et c'est l'étalon coloré qui est variable : il est formé d'un verre coloré prismatique qui est vu sous une épaisseur variable suivant ses déplacements.

Hémoglobinimètre de Gowers. — L'appareil se compose essentiellement : 1° d'un tube de verre cylindrique contenant une solution glycérinée de picrocarmin ; il est scellé et sert d'étalon coloré ; 2° d'une éprouvette de même diamètre que le tube étalon et graduée de 10 à 120. On fait avec une pipette spéciale une solution de sang à 1 p. 25, on la verse dans l'éprouvette ; on ajoute ensuite goutte à goutte de l'eau distillée jusqu'à égalisation des deux teintes. La quantité d'hémoglobine est exprimée par le volume du liquide ajouté ; le chiffre lu au niveau de l'effleurement donne l'hémoglobine exprimée en pour cent d'un sang normal dont la valeur est 100. Cet appareil n'est applicable qu'aux recherches cliniques chez l'homme où il peut rendre des services ; mais il ne peut être comparé comme précision aux colorimètres que nous avons décrits ; son principal inconvénient, en dehors de la notation arbitraire, résulte dans ce fait qu'il n'est pas possible de revenir en arrière si l'égalisation des teintes a été dépassée par l'addition d'un peu trop de liquide. Cet appareil a été modifié par *Sahli :* l'oxyhémoglobine est dosée à l'état d'hématine, l'eau distillée étant remplacée par une solution faible d'acide chlorhydrique ; l'étalon est formé par une solution d'hématine (1).

Procédé de Tallqvist. — Le procédé de Tallqvist (2), tout à fait distinct des

(1) D'autres appareils colorimétriques comme celui de Fleischl-Miescher, dosent l'hémoglobine à l'état d'hématine en solution alcaline.

(2) Tallqvist, *Zeitschrift f. klin. Medicin*, XL, 1900, et *Archives gén. de médecine*, III, 1900.

méthodes colorimétriques ordinaires, qui comparent des solutions examinées par transparence, consiste essentiellement à comparer la teinte donnée par une tache de sang pur, fraîche, faite sur du papier blanc un peu absorbant, à une échelle de teintes, imitée de celle de Welcker, exprimant la quantité d'hémoglobine en pour cent du sang normal arbitrairement fixé à 100. La tache est faite sur un papier absorbant spécial ; la comparaison est faite, dès que le sang est absorbé, dès que la tache a cessé d'être brillante, et avant qu'elle ne soit sèche. C'est un élégant et très simple procédé destiné aux examens cliniques extemporanés. Les résultats qu'il fournit, sans pouvoir être comparés à ceux que donnent les bons colorimètres, sont aussi précis que ceux qu'on obtient avec les hémoglobinimètres de Gowers et de Sahli.

Opacimètres. — Un certain nombre d'appareils sont basés sur un tout autre principe que les colorimètres : ils expriment le degré d'opacité ou de transparence du sang pur ou du sang dilué avec des liquides conservant les globules rouges. Mais ces appareils donnent des résultats très nettement inférieurs aux colorimètres.

Résultats du dosage de l'hémoglobine. Variations physiologiques et pathologiques. — Dans les examens dont nous allons donner le résultat, la matière colorante du sang a été dosée en général au contact de l'air, à l'état d'oxyhémoglobine, sans que l'on se soit préoccupé de la proportion relative d'hémoglobine réduite ou d'oxyhémoglobine qui était contenue dans le sang circulant.

Les résultats des divers auteurs sont concordants. Les différences des chiffres tiennent à la méthode employée et à l'équation personnelle, mais les variations relatives sont les mêmes et ce sont les seules qui sont importantes. Nous tiendrons compte surtout, naturellement, des résultats comparables, notés en poids vrais d'hémoglobine.

Quantité d'hémoglobine à l'état normal, dans la série animale. — Chez l'homme adulte, la quantité d'hémoglobine contenue dans 100 cc. de sang est d'environ 13 gr., soit 0 gr. 00013 par mm.c. Chez le chien, elle est un peu plus forte ; chez les petits mammifères de laboratoire, chez le lapin et le cobaye, elle est au contraire moins grande. Si des Mammifères on descend dans la série des Vertébrés, la richesse du sang en hémoglobine diminue progressivement. comme on le voit nettement d'après les chiffres du tableau ci-contre, tous empruntés à *Malassez* (1). Les Oiseaux se rapprochent

(1) Malassez, *Archives de physiologie*, 1877.
Quinquaud, *C. R. Ac. des sc.*, 18 août 1873.
Subbotin, *Zeitschrift f. Biologie*, VII, 1871.
Quincke, *Virchow's Archiv*, LIV, 1872.

des Mammifères (1). La quantité d'hémoglobine diminue chez les Reptiles, plus encore chez les Batraciens, davantage encore chez les Poissons. D'une manière générale, l'hémoglobine diminue en même temps que le nombre des hématies, mais ces variations ne sont pas parallèles, de sorte que la quantité d'hémoglobine contenue dans un globule rouge, ce qu'on nomme la valeur ou richesse globulaire, n'est pas un chiffre constant.

QUANTITÉ D'HÉMOGLOBINE A L'ÉTAT NORMAL, DANS LA SÉRIE DES VERTÉBRÉS

ESPÈCES EXAMINÉES	NOMBRE D'HÉMATIES par mm. c.	HÉMOGLOBINE en gr. p. 100 cc.	VALEUR GLOBULAIRE en μμ gr.
MAMMIFÈRES :			
Homme	4.310.000	12,9	29,9
Cobaye	4.284.000	9,2	21,6
Lapin	4.350.000	9,0	20,7
OISEAUX :			
Poulet	2.540.000	12,3	48,3
Pigeon	2.950.000	15,4	52,2
REPTILES :			
Lacerta agilis	1.375.000	9,6	70,5
Lacerta viridis	840.000	7,2	85,6
Tropidonotus natrix	730.000	9,4	129,9
POISSONS :			
Anguilla muræna	1.626.000	9,1	55,9
Abramis brama	859.000	4,3	51,2
Leuciscus dobula	860.000	3,1	36
Leuciscus rutilus	840.000	3,6	44,6
Torpedo marmorata	76.000	1,4	190
BATRACIENS :			
Rana fusca	371.000	8	216,5
Rana viridis	250.000	5,3	229,6
Proteus anguineus	45.000	4,8	1.066,6

Nous examinerons plus loin les relations qui existent entre le nombre des hématies, leur volume et la richesse du sang en hémoglobine. Il n'est pas sans intérêt de remarquer que chez les Poissons, comme chez les Batraciens, ce sont les types considérés comme les plus anciens (Poissons cartilagineux, Batraciens urodèles) qui possè-

(1) Il est probable que les chiffres trouvés par MALASSEZ et d'autres auteurs par la colorimétrie chez les Oiseaux sont un peu forts, parce qu'il n'a pas été tenu compte de l'opacité que donne la présence des stromas nucléés.

dent aussi les globules les moins nombreux et la quantité d'hémoglobine la plus faible (1).

Variations individuelles Variations physiologiques. — Les conclusions que nous venons d'exprimer ne sont vraies que si l'on considère l'ensemble des résultats, car, dans la même classe, il peut exister, entre les espèces, de très grandes différences, comme on le voit très bien dans le tableau. Si on s'adresse à une espèce déterminée, la quantité d'hémoglobine est exprimée par un chiffre assez fixe : les variations individuelles sont limitées. Chez l'homme, l'hémoglobine varie de 12 à 13,5 chez des citadins ; les variations sont à peu près de même grandeur, quand, au lieu d'examiner des individus différents, vivant dans les mêmes conditions, on examine un même individu, à différents intervalles.

Chez l'homme, c'est toujours le sang capillaire cutané qu'on examine ; mais il n'en est plus de même chez les animaux d'expérience; il est donc bon de connaître les variations qui dépendent des vaisseaux où le sang a été puisé. D'une manière générale, et en laissant de côté le sang des gros vaisseaux, toujours constant, on trouve plus d'hémoglobine dans le sang des veines que dans le sang des petites artères, ce qui tient à ce que les globules rouges sont plus nombreux dans le sang veineux. Cette augmentation d'hémoglobine est donc en rapport avec le ralentissement du cours du sang et soumise aux influences circulatoires que nous avons examinées dans le chapitre précédent, à propos du nombre des globules rouges (2).

Influence du sexe. — On trouve en général un peu moins d'hémoglobine chez la femme que chez l'homme, ce qui est en rapport avec le nombre des globules rouges, un peu moins grand chez la femme. Chez des individus de même âge et vivant dans les mêmes conditions, on trouve en moyenne chez la femme 12,5 et chez l'homme 13,5. De pareilles différences se voient aussi chez les autres mammifères.

Conditions de vie. — Comme le nombre des hématies, chez un même individu ou chez une même espèce, toutes autres conditions étant

(1) Les Poissons, dont le sang est souvent moins riche en hémoglobine que celui des Batraciens, ont cependant des globules rouges plus nombreux ; mais leurs hématies sont beaucoup plus petites.

(2) Il en est de même pour les augmentations d'hémoglobine qu'on trouve à la suite des pertes d'eau, dans l'œdème, etc. Elles sont parallèles aux augmentations du nombre des hématies et dues, comme elles, à la concentration du liquide sanguin, c'est-à-dire aux changements de rapports entre les globules et le plasma.

égales, la quantité d'hémoglobine est en rapport avec l'activité des échanges. Chez l'homme, tandis que les chiffres trouvés chez des adultes vivant à la ville oscillent autour de 13 et sont souvent inférieurs, ils se rapprochent de 14 chez les individus de même âge vivant à l'air libre, à la campagne ou au bord de la mer. Des variations de 1 gramme (pour 100 cc.) peuvent se voir facilement chez le même individu transporté de la ville à la campagne ou inversement; le travail musculaire, les exercices modérés, agissent dans le même sens.

Influence de l'âge. — Un grand nombre d'observations concordantes montrent que chez l'homme, au moment de la naissance, la quantité d'hémoglobine contenue dans l'unité de volume du sang périphérique est plus grande que chez l'adulte (1). L'hémoglobine diminue pendant les premiers jours d'une manière notable et cette chute se prolonge jusqu'au 15e ou 20e jour, pendant toute la première année d'après certaines observations.

Ce phénomène a été expliqué de différentes façons. Le chiffre élevé de l'hémoglobine trouvé en général à la naissance coïncide généralement avec un nombre également élevé de globules rouges; beaucoup d'auteurs attribuent ces chiffres à une concentration plus grande du sang, aux pertes de liquide et à l'inanition des premières heures (perte d'eau par l'évaporation pulmonaire et cutanée, par le rejet du méconium, etc.). La chute de l'hémoglobine, comme celle des hématies, serait consécutive au premier repas et exprimerait la tendance du sang à reprendre graduellement son équilibre de concentration. Cette explication est en concordance avec les observations de *Lépine* qui a vu l'augmentation du nombre des globules rouges pendant les premières heures de la vie extra-utérine, pendant la période d'inanition, et leur diminution après le premier repas. Cette explication est aussi en rapport avec les chiffres forts de globules blancs trouvés en général à la naissance et à la chute leucocytaire observée par certains auteurs après 3 ou 4 jours.

L'abaissement de l'hémoglobine et des globules rouges observé pendant les premiers jours de la vie extra-utérine serait ainsi un phénomène de même ordre que la perte de poids brusque qu'on observé en général chez le nouveau-né avant le relèvement définitif de la courbe de croissance.

D'autres auteurs, se basant sur l'ictère qu'on observe si fréquem-

(1) M. Labbé, *Revue de médecine*, XX, 1900.

ment chez les nouveau-nés, ont admis une diminution vraie, expliquée par la destruction d'un certain nombre de globules rouges. Les chiffres forts du début exprimeraient alors un phénomène compensateur, provenant de l'activité de l'hématopoièse et permettant à l'organisme de supporter ces destructions.

On peut encore expliquer autrement les faits. Au moment de la naissance, chez l'homme et les Mammifères, les conditions de la circulation se trouvent absolument changées : la circulation placentaire cesse, la circulation pulmonaire est portée au maximum ; de plus, le sang afflue vers la peau pour permettre au jeune organisme de lutter contre le refroidissement. Les chiffres forts de globules rouges et d'hémoglobine trouvés à la naissance exprimeraient cet afflux périphérique et l'abaissement qui suit la naissance serait expliqué par le retour à la normale par adaptation. Cependant, les observations faites chez les animaux, où on peut examiner comparativement le sang profond et le sang périphérique ne sont pas très en faveur de cette dernière hypothèse. J'ai obtenu, en effet, comme moyenne d'un grand nombre d'observations, chez le rat blanc, dans le sang profond et dans le sang périphérique :

au 1er jour :	10,2	et	12,2
au 3e jour :	8,8	et	10,6
au 8e jour :	7,9	et	9,1

Le sang périphérique est toujours un peu plus riche, ce qui est naturel ; mais la concordance est remarquable entre les deux sangs ; comme le sang périphérique, le sang profond est donc riche en hémoglobine à la naissance et la chute du 1er au 3e jour est brusque dans les deux sangs.

Il n'est donc pas possible d'expliquer par la répartition inégale les faits que nous venons d'examiner. Peut-être les variations de la concentration entrent-elles pour une part dans cette chute brusque qu'on observe après la naissance aussi bien chez l'homme que chez les animaux. Mais les variations de concentration ne peuvent en tout cas expliquer la prolongation de la chute d'hémoglobine qui s'observe quelquefois chez l'homme pendant les premiers mois de la vie. Cette diminution de l'hémoglobine est plus forte que la diminution du nombre des hématies ; elle existe parfois, alors que le nombre des globules rouges ne se modifie pas ; elle est donc due à une autre cause. Il s'agit ici, en effet, d'une diminution vraie de l'hémoglobine, due à l'alimentation lactée exclusive, très pauvre en fer. Cette pauvreté en fer du régime lacté est souvent bien compensée chez le nou-

veau-né humain, par suite des réserves de fer contenues dans le foie, et alors l'hémoglobine diminue peu ; mais le fait est constant et facile à observer chez certaines espèces animales, pendant la lactation. Il apparaît avec la plus grande netteté dans les tracés obtenus chez le rat, et où la courbe de l'hémoglobine est tout à fait indépendante de celle des hématies : l'hémoglobine subit une chute brusque dans les huit premiers jours qui suivent la naissance, reste à un taux très bas jusqu'au 15e ou 20e jour, se relève ensuite lentement et ne se relève ensuite plus fortement qu'au début du 2e mois, à la fin de l'allaitement (1). Chez l'homme, la pauvreté de l'alimentation lactée en fer n'est pas toujours compensée par le fer des tissus ; lorsqu'elle est trop prolongée, elle peut, chez certains enfants prédisposés, devenir une cause d'anémie véritable (2).

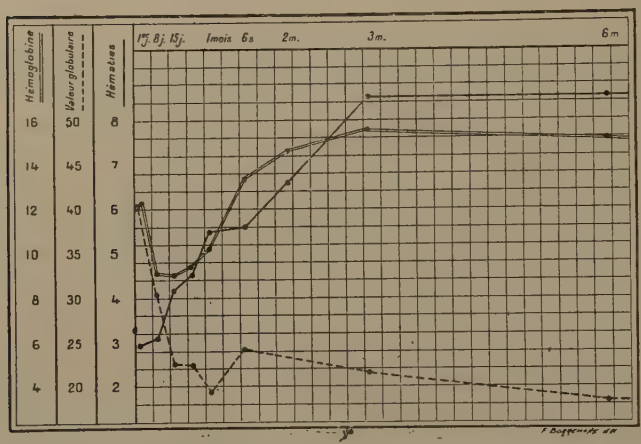


Fig. 133. — Courbes du nombre des hématies, de l'hémoglobine et de la valeur globulaire chez le rat, depuis le jour de la naissance jusqu'à l'âge de 6 mois, dans le sang périphérique. Hématies exprimées en millions par millimètre cube ; hémoglobine en grammes pour 100 centimètres cubes de sang ; valeur globulaire en μμ grammes.

Pendant la première et la seconde enfance, on trouve en général des chiffres d'hémoglobine un peu plus faibles que chez l'adulte (11-12). D'après certaines recherches (3) ce ne serait guère que vers la quinzième année que les chiffres de l'adulte (13 à 14) seraient atteints. Le taux de l'hémoglobine se maintient sans changement jusqu'à la fin de la vie. Chez le vieillard, il reste en effet le même que chez l'adulte ; la diminution d'hémoglobine qui peut quelquefois survenir est souvent compensée par une légère concentration du sang, de sorte qu'elle se trouve masquée.

(1) Jolly, *Soc. de Biologie*, 23 janvier 1909.
(2) Voir chap. xvi.
(3) Schiff, *Zeitschrift f. Heilkunde*, XI, 1890. — Reinert, *Die Zählung der Blutkörperchen*, Leipsig, 1891. — Schwinge, *Pflüger's Archiv f. die ges. Physiologie*, LXXIII, 1898.

Vie sexuelle. — D'après les recherches que nous venons de citer, ce n'est qu'au moment de la puberté, vers l'âge de 15 ou 16 ans, que le sang de l'homme aurait son taux normal d'hémoglobine. Il est probable que le fait est en rapport avec l'ensemble des phénomènes de croissance qui sont considérables à cette époque et qui, s'ils ne sont pas compensés, provoquent justement des anémies particulières. Chez certains animaux, le phénomène peut être observé avec la plus grande netteté. Il faut choisir de préférence des animaux qui, comme le rat, naissent peu développés. L'augmentation se fait ici pendant la période rapide de croissance, entre 1 mois et 3 mois, c'est-à-dire entre la cessation de l'allaitement et l'époque de la maturité sexuelle (1).

Les modifications légères qui se produisent pendant le cycle sexuel, à l'occasion de la menstruation et de la gestation, sont parallèles à celles du nombre des globules rouges. Il en est de même après l'accouchement, sauf dans les cas où, par suite d'hémorragies abondantes, l'hémoglobine arrive à s'abaisser plus que le nombre.

Influence du rythme saisonnier. Hibernation. — Chez l'homme et chez les animaux dont le genre de vie n'est pas modifié par les saisons, on trouve souvent une très légère augmentation de l'hémoglobine en hiver ; cette différence, qui est parallèle à celle du nombre des globules rouges, est due à une activité plus grande des échanges destinée à compenser l'abaissement de température pendant la saison froide. On peut observer aussi le contraire chez le citadin qui, confiné l'hiver dans une atmosphère chauffée artificiellement, respire un air plus vif et plus pur pendant la belle saison.

Chez les animaux qui hivernent, c'est-à-dire qui, ne pouvant lutter contre la déperdition de chaleur, réduisent au minimum leurs échanges et tombent dans un engourdissement spécial, le taux d'hémoglobine s'abaisse à la fin de l'hibernation. Mais, comme on le voit chez la marmotte (2), au début de la période de torpeur, par suite d'une concentration du sang en globules, ce sont au contraire, des chiffres plus forts que l'on observe.

Pertes d'eau. Alimentation. Régimes. — Les augmentations des globules rouges consécutives aux pertes de liquide (sudation, œdème), et qui sont dues à une concentration de sang en hématies, s'accompagnent toujours d'une augmentation de l'hémoglobine parallèle, due à la même cause et toute relative par conséquent. Dans le jeûne complet

(1) Voir aussi chap. XI et chap. XVI.
(2) R. Dubois, Physiologie comparée de la marmotte, Paris, 1896.

sans eau, c'est cette concentration par privation de liquide qui explique les augmentations qu'on peut observer au début de l'expérience; si le jeûne est prolongé, le taux d'hémoglobine s'abaisse; le fait s'observe mieux lorsque le jeûne est mitigé et longtemps prolongé (1). Nous avons montré plus haut l'influence du régime lacté pauvre en fer sur le taux d'hémoglobine; le fait est particulièrement frappant pendant la période de croissance de l'organisme, mais on peut le voir, chez l'homme ou chez l'animal adulte, lorsque l'alimentation lactée exclusive est longtemps prolongée. L'insuffisance de l'apport alimentaire peut être compensé par l'organisme lui-même ou par le fer médicamenteux.

Altitude. Pression atmosphérique. Raréfaction de l'oxygène. — Les augmentations de globules rouges causées par le climat d'altitude sont accompagnées régulièrement d'une augmentation parallèle de l'hémoglobine. Ces augmentations d'hémoglobine sont réelles, comme les hyperglobulies. Quant aux augmentations brusques et ordinairement plus légères de l'hémoglobine et des hématies qu'on observe dans les ascensions en ballon ou en montagne, elles sont probablement relatives et dues à une répartition inégale sous des influences vaso-motrices (2).

VALEUR GLOBULAIRE

Dans les faits que nous venons d'examiner, les variations du taux d'hémoglobine sont en général parallèles aux variations du nombre des globules rouges et dépendent de ces variations. Lorsqu'on s'adresse à une espèce animale déterminée, et qu'on reste dans les conditions physiologiques, c'est ce qu'on observe le plus souvent. Mais, déjà à l'état physiologique, pendant la période de croissance, a courbe de l'hémoglobine est tout à fait distincte de celle des hématies. Si on considère les faits pathologiques, cette divergence entre les deux courbes apparaît avec la plus grande netteté; les diminutions et les augmentations d'hémoglobine ne sont plus proportionnelles aux diminutions et aux augmentations du nombre des globules. Il en est de même si on compare des espèces animales différentes, à l'état physiologique : en général, les différences concernant le nombre sont plus grandes que celles qui concernent l'hémo-

(1) Voir chap. XVI.
(2) Voir chap. III.

globine. Cela tient à ce que la quantité d'hémoglobine contenue dans chaque globule, et qu'on nomme la richesse globulaire, valeur hémoglobique ou *valeur globulaire*, varie d'une espèce à l'autre à l'état normal et varie aussi chez la même espèce dans certaines conditions, surtout à l'état pathologique. Or, c'est justement cette valeur qu'il est important de connaître; c'est elle qui indique la qualité des globules; c'est elle qui exprime le mieux le pouvoir respiratoire du sang. Celui-ci ne dépend pas seulement, en effet, de la quantité d'hémoglobine contenue dans l'unité de volume de sang, ni du nombre des globules rouges considéré isolément; il dépend de ces deux facteurs, c'est-à-dire de la manière dont l'hémoglobine se trouve répartie et utilisée. La même quantité d'hémoglobine, répartie sur un plus grand nombre d'hématies, en multipliant les surfaces d'échanges augmente aussi le pouvoir respiratoire du sang. La *valeur globulaire* représente donc la manière plus ou moins favorable dont l'hémoglobine est utilisée, c'est le *coefficient d'utilisation*. Elle est exprimée par le rapport $Vg = \frac{H}{n}$ dans lequel H est la quantité d'hémoglobine et n le nombre d'hématies contenues dans 1 mmc. de sang. Si par exemple, nous prenons un homme adulte à l'état de santé, dont le sang contient 13 gr. 5 d'hémoglobine pour 100 cc., soit 0 gr. 000135 par mmc. et 4.500.000 hématies, la valeur globulaire sera représentée par le rapport $\frac{0,000135}{4.5000.000}$ soit *30* (exprimé en $\mu\mu$ gr.). Cette importante notion, entrevue par *J. Duncan* dans la chlorose en 1867 (1), a été établie par *Malassez* et par *Hayem* (2). Chez l'homme, à l'état physiologique, elle est d'environ 28 à 30. De même qu'il n'existe pas un nombre *normal* de globules rouges, ni une quantité *normale* d'hémoglobine et fixe par mmc., de même il n'y a pas de chiffre normal exprimant, chez l'homme, la valeur globulaire; mais les variations de cette valeur oscillent dans des limites plus étroites que le nombre des globules rouges et que la quantité d'hémoglobine (3).

Valeur globulaire dans la série des Vertébrés. Relation avec le volume des hématies. Titre hémoglobique. — D'une manière générale, si on descend la série des Vertébrés, le nombre des globules

(1) Duncan, *Sitz. der K. Ak. der Wiss*, Wien, LV, 1867.

(2) Malassez, Thèse, 1873, et *Archives de physiologie*, 1877. — Hayem, *C. R. Ac. des sciences*, 17 juillet 1876, et *Du sang*, Paris, 1889.

(3) Ce qui s'explique puisque la valeur globulaire exprime la qualité de l'hématie.

rouges diminue et la valeur globulaire augmente. Les Batraciens et les Poissons cartilagineux sont les vertébrés qui ont le moins de globules rouges et ce sont aussi ceux dont la valeur globulaire est la plus grande ; les Reptiles viennent ensuite, puis les Oiseaux, et après les Mammifères. Cette progression ne suit pas exactement l'ordre zoologique, car les Poissons osseux se trouvent placés, pour la valeur globulaire, entre les Reptiles et les Oiseaux ; cela tient à ce qu'ils ont autant de globules que les Reptiles, mais beaucoup moins d'hémoglobine qu'eux. C'est chez les Batraciens, et particulièrement chez les Urodèles, que la valeur globulaire est la plus grande. Cela tient à ce qu'ici l'hémoglobine est répartie sur un très petit nombre de globules, dont les dimensions, comparées à celles des Mammifères, sont énormes. En général, dans la série des Vertébrés, au fur et à mesure que le nombre diminue, le volume des globules augmente ; mais les valeurs globulaires ne sont pas proportionnelles aux volumes globulaires (1). La richesse en hémoglobine de la substance globulaire (le *titre hémoglobique*) (2) n'est donc pas constante.

Plus les globules sont volumineux, plus le titre hémoglobique est faible, comme il résulte des chiffres du tableau suivant, empruntés à

	Nombre des hématies	Quantité d'hémoglobine par mm.c.	Valeur globulaire en μμ gr.	Volume globulaire en μ cube	Titre hémoglobique pour 1 μ cube de substance globulaire
Homme	4.500.000	0.135	30	72	0.416
Pigeon	2.950.000	0.154	52	125	0.416
Lézard agile	1.375.000	0.096	70	201	0.348
Grenouille rousse	371.000	0.080	216	629	0.343
Protée	45.000	0.048	1.066	9200	0.115

Malassez (3). Ces différences ne peuvent être expliquées par la présence du noyau. L'augmentation de surface et la diminution du titre

(1) Les énormes globules du protée, 127 fois plus volumineux que ceux de l'homme, sont seulement 35 fois plus colorés.

(2 $\frac{\text{Valeur globulaire}}{\text{Volume moyen}}$ = quantité d'hémoglobine par unité de volume de la substance globulaire, ou titre hémoglobique (Malassez).

(3) Ce tableau a été obtenu en utilisant les évaluations volumétriques faites par Welcker. J'ai simplement ajouté, comme éléments de comparaison, le nombre des hématies et le poids d'hémoglobine d'après les chiffres de Malassez. La méthode d'évaluation du volume de Welcker a été donnée au chapitre III.

hémoglobique qui en résulte compensent jusqu'à un certain point la diminution du nombre des hématies.

Variations physiologiques de la valeur globulaire. — Quand on s'adresse à une espèce déterminée, les variations de la valeur globulaire sont en général peu considérables d'un individu à l'autre. Les différents états physiologiques n'ont en général aucune influence sur la valeur globulaire dont les modifications indiquent presque toujours un trouble de la nutrition, une insuffisance de l'hémopoièse. Il faut des hémorragies ou des causes pathologiques pour les provoquer. Il n'en est plus de même si l'on s'adresse à des organismes en voie de développement. Les faits sont faciles à constater, même après la naissance chez certains animaux dont le développement intra-utérin est très court. L'examen comparatif des courbes de l'hémoglobine, du nombre des hématies et de la valeur globulaire chez le rat sont des plus instructives. La courbe de l'hémoglobine ne se relève qu'après le nombre des globules rouges ; il s'ensuit que la courbe de la valeur globulaire est nettement descendante pendant la croissance; elle atteint alors 18 dans le sang périphérique et se maintient à ce chiffre pendant toute la vie.

L'hémoglobine, après sa chute initiale, dont la cause est, comme nous l'avons vu, l'insuffisance de l'apport du fer par l'allaitement, ne s'élève ensuite qu'après le nombre des globules rouges. C'est là un fait important et d'ordre général. Dans tous les cas où l'on a étudié avec soin le mode de réparation du sang, soit à la suite des hémorragies, soit à la suite des différents états pathologiques qui ont provoqué l'anémie, on constate le même fait. L'élaboration de l'hémoglobine est lente ; l'organisme la distribue le plus tôt possible sur un grand nombre de globules et c'est la multiplication cellulaire qui est le premier acte de la réparation. Elle marche plus vite que l'élaboration de la substance active, d'où l'abaissement du poids d'hémoglobine contenu dans chaque globule. Chez les mammifères qui ont à la naissance leur chiffre de globules définitif, ces faits sont moins apparents ; mais on peut les observer, au cours du développement embryonnaire (1).

Chez les petits mammifères employés dans nos expériences, la valeur globulaire est plus faible que chez l'homme (20 à 21 chez le cobaye et le lapin, 18 environ chez le rat). Chez le cobaye et le lapin, dont le nombre des globules rouges est assez voisin de celui de l'homme, un peu plus faible seulement (4.300.000 environ), l'abaisse-

(1) Voir sur cette question, chap. XI, XVI et XVIII.

ment de la valeur globulaire tient à l'abaissement du taux d'hémoglobine (9 à 10 gr. au lieu de 12 à 14 chez l'homme). Ces animaux peuvent donc être considérés comme moins bien avantagés que l'homme au point de vue de la valeur respiratoire du sang. Chez le rat au contraire, le taux d'hémoglobine est plus fort que chez l'homme (15 à 16 dans le sang périphérique) ; si la valeur globulaire est basse (18), c'est que le nombre des globules rouges est énorme (1).

Le rat, ayant une quantité d'hémoglobine plus forte, distribuée sur un nombre de globules rouges presque double, se trouve donc, au point de vue de la valeur respiratoire du sang, plus avantagé que l'homme. La surface d'échange est énorme ; on peut se demander si le fait ne sert pas à compenser, jusqu'à un certain point la perte de chaleur, beaucoup plus grande, naturellement, chez les mammifères de petite taille.

Il résulte des exemples que nous venons d'examiner, que si l'on compare des mammifères différents, la valeur globulaire ne pourra donner de renseignements directement utilisables que si l'on compare des espèces possédant des chiffres de globules à peu près semblables. Il en résulte aussi que, au point de vue de la valeur respiratoire du sang, ce qu'il importe de considérer, ce n'est pas seulement la quantité d'hémoglobine, c'est encore la surface sur laquelle elle est distribuée. Admettons pour un instant qu'il s'agisse de mammifères ayant des globules de même diamètre ; la surface variera comme le nombre ; les valeurs globulaires varieront comme les quantités d'hémoglobine par unité de surface. Mais s'il s'agit de globules de dimensions différentes, la surface dans l'unité de volume du sang sera donnée à la fois par le nombre et par le diamètre. Plus le sang contiendra d'hémoglobine, plus sa valeur respiratoire sera grande, mais plus cette hémoglobine sera distribuée sur une grande surface, plus cette valeur respiratoire augmentera. La valeur respiratoire, exprimant l'intensité des échanges possibles, sera fonction, et de la quantité d'hémoglobine, et de la surface (2).

Le lama, qui a des globules rouges extrêmement nombreux, d'une minceur beaucoup plus grande que ceux des autres mammifères (3), a, dans le sang, son hémoglobine répartie sur une surface immense et paraît donc, à ce point de vue, particulièrement favorisé.

En parlant de la valeur respiratoire du sang, il est bon de remar-

(1) 8 à 9 millions dans le sang périphérique.

(2) Ce qu'on peut exprimer par le rapport VR = SH dans lequel S est la surface globulaire et H la quantité d'hémoglobine par mmc. de sang.

(3) Jolly, *Soc. de Biologie*, 7 février 1920.

quer, cependant, que les échanges gazeux ne sont pas en général modifiés par la diminution du nombre des globules rouges et de l'hémoglobine. Ainsi, dans les anémies, même très accentuées, les échanges gazeux (oxygène absorbé, acide carbonique exhalé, par kilogramme et par minute) sont, à peu de chose près normaux, comme ils le sont du reste chez les animaux placés dans l'air raréfié (1). Dans ces cas, les hématies empruntent donc à l'air extérieur, des quantités d'oxygène suffisantes pour les besoins des tissus. Mais le travail des cellules sanguines est naturellement beaucoup plus intense et leur usure est probablement plus rapide. C'est là peut-être qu'il faut chercher une des causes de l'affaiblissement de ces malades (2).

Variations de la valeur globulaire à l'état pathologique. — C'est surtout dans l'étude des états pathologiques que la notion de la valeur globulaire est importante à considérer. Elle est indispensable pour apprécier le degré d'anémie. Lorsque celle-ci est légère, la chute de l'hémoglobine est en général parallèle à celle des globules et la valeur globulaire n'est pas modifiée. Mais si l'anémie est plus forte, ou si la cause qui l'a produite persiste, la valeur globulaire baisse et cet abaissement donne les indications les plus utiles. Dans les anémies dues à des troubles profonds de la nutrition et de l'hémopoièse, dans la chlorose en particulier, l'abaissement de la valeur globulaire est constant et net, bien que le nombre des globules puisse quelquefois rester normal. Dans les anémies graves où le nombre des globules descend très bas, on voit le contraire : la chute de l'hémoglobine est moins forte que celle des globules, de sorte que la valeur globulaire est légèrement augmentée (3).

Quantité d'hémoglobine minima compatible avec la vie. — La quantité d'hémoglobine minima compatible avec la vie, chez les différentes espèces animales, n'est pas connue exactement. Chez l'homme, si l'on en juge d'après les cas connus d'anémie post-hémorragique et d'après l'étude des anémies graves, le taux de l'hémoglobine ne semble guère pouvoir descendre au-dessous de 2 grammes pour 100 cc. de sang, soit 6 fois et demi moins que la normale, tandis que le nombre des globules rouges peut descendre jusqu'aux environs de 500.000 par mmc., soit 9 fois moins que la normale. Il s'ensuit qu'à ces limites extrêmes, la valeur globulaire est naturellement augmentée. Il va de

(1) Lambling, *Biochimie*, 3e éd.
(2) Voir aussi chap. III, XVI et XVII.
(3) Voir chap. XVI.

soi que ces limites varient suivant les circonstances ; c'est ce que nous verrons en étudiant l'anémie post-hémorragique (ch. XVI).

Quantité totale d'hémoglobine. Rapport avec le poids du corps. — La quantité totale d'hémoglobine contenue dans le corps peut être appréciée par la méthode de Welcker que nous avons exposée à propos de la masse totale du sang (ch. III). Cette méthode ne peut s'appliquer qu'aux animaux, et comme dans chaque cas il faut sacrifier l'animal, l'étude des variations physiologiques ne peut donner que des résultats approchés. On peut cependant tirer de cette étude un renseignement intéressant, c'est que le poids total d'hémoglobine est dans un rapport constant avec le poids du corps (1). Par kilogramme de poids vif on a trouvé chez le lapin 3 gr. 47 d'hémoglobine et chez le chien 7 gr. 64. Chez l'homme, connaissant d'une manière approchée le nombre total des globules rouges (voir ch. III), *Malassez* (2) a trouvé 8 gr. 5 d'hémoglobine par kilogramme.

Cette notion est intéressante parce qu'elle exprime une relation fonctionnelle, la relation entre la quantité d'hémoglobine totale et le poids des tissus qu'elle est chargée d'alimenter en oxygène. Une masse de sang plus grande peut, jusqu'à un certain point, compenser un taux d'hémoglobine plus faible.

Hémoglobine musculaire. — Les muscles contiennent une certaine quantité d'hémoglobine, décelable par l'examen spectroscopique d'un muscle dont les vaisseaux ont été lavés et complètement débarrassés de leur sang. Ce sont les muscles striés rouges qui contiennent le plus d'hémoglobine, et particulièrement le diaphragme et le cœur. Les muscles striés blancs en contiennent infiniment moins. Les muscles lisses n'en contiennent aucune quantité appréciable (3). Avec le suc des muscles rouges on a pu obtenir des cristaux d'hémine (4).

DÉRIVÉS DE L'HÉMOGLOBINE

Nous avons étudié l'hémoglobine sous ses deux états physiologiques : oxyhémoglobine et hémoglobine réduite (5). L'hémoglobine est, de plus, capable de former des combinaisons avec d'autres gaz que l'oxygène : avec l'oxyde de carbone et avec le bioxyde d'azote par son fragment chromogène (hématine) (6), avec l'anhydride carbonique par son fragment protéique (globine). L'hémoglobine pré-

(1) Subbotin, *Zeitschrift f. Biologie*, VII, 1871. Il est probable que, comme l'a montré *Richet* pour le nombre total des hématies (ch. III), entre individus de même espèce, le poids total d'hémoglobine est proportionnel à la surface du corps.

(2) Malassez, *Archives de physiologie*, 1877. Ce chiffre de Malassez est probablement un peu faible parce qu'il a attribué au globule normal une valeur basse (25 μμ gr.).

(3) Ranvier, *Archives de physiologie*, 1874, et *Traité technique*, Paris. — Hénocque, *Spectroscopie des organes*, Paris, Masson. — Ray Lankester, *Plüger's Archiv*, IV, 1871. — Lehmann, *Zeitschrift f. Biologie*, XLV, 1904.

(4) Kühne, *Virchow's Archiv*, XXXIII, 1865.

(5) Pour les quantités comparées d'oxyhémoglobine et d'hémoglobine réduite contenues dans le sang, consulter les *Traités de physiologie*.

(6) L'hémoglobine est capable aussi de contracter des combinaisons avec le cyanogène, avec l'acétylène, etc. Pour leur étude, consulter les *Traités de toxicologie*.

sente, de plus, à considérer de nombreux dérivés chimiques dont l'étude dépasse naturellement le cadre de cet ouvrage et dont nous ne parlerons qu'au point de vue microspectroscopique et microcristallographique et pour expliquer les transformations que le pigment sanguin peut subir dans l'organisme, soit à l'état normal, soit dans les intoxications.

Méthémoglobine. — Si à une solution d'oxyhémoglobine faite tout simplement en laissant tomber un peu de sang dans de l'eau distillée, on ajoute quelques gouttes d'une solution concentrée de ferricyanure de potassium, la solution devient brune : l'oxyhémoglobine a été transformée en *méthémoglobine*. Ce corps nouveau est généralement considéré comme un *isomère* de l'oxyhémoglobine. Il contiendrait autant d'atomes d'oxygène, mais deux de ces atomes seraient stables et inactifs ; la méthémoglobine est ainsi incapable de remplir les fonctions respiratoires propres à l'hémoglobine.

Fig. 134. — Cristaux de méthémoglobine du lapin. Sang traité par le nitrite de sodium. D'après Hénocque.

La transformation de l'oxyhémoglobine en méthémoglobine est réalisée par un grand nombre d'agents : chaleur, dessiccation, oxydants, réducteurs, etc. La méthémoglobine n'existe pas à l'état normal dans l'organisme, mais elle apparaît dans le sang et dans l'urine au cours de certaines intoxications par des substances oxydantes (chlorate de potassium, acide chromique — intoxications professionnelles par la nitrobenzine, la nitroglycérine, etc.) et par des substances réductrices (aniline et ses dérivés, phénylène diamine, hydroquinone, pyrocatéchine, etc.). La plupart des agents méthémoglobinisants réducteurs détruisent les globules rouges et produisent de la méthémoglobinurie et de l'ictère (1).

On peut préparer directement les cristaux de méthémoglobine soit au moyen du sang d'un animal intoxiqué par un des poisons cités plus haut, (2) soit en transformant directement l'hémoglobine du sang sur lame par divers réactifs (nitrites, chlorate de potasse, etc.). Ces cristaux ont la même forme que les cristaux d'oxyhémoglobine, mais ils sont de couleur brunâtre. Ils sont aussi plus stables et le premier produit de la transformation des cristaux d'oxyhémoglobine, inclus dans le baume en préparation microscopique, est justement la méthémoglobine.

Les solutions aqueuses neutres ou légèrement acides ont une couleur brune ; les solutions aqueuses alcalines ont une belle teinte rouge. Les caractères spectroscopiques varient suivant la réaction du milieu. En solution neutre ou acide, la

(1) Pour les empoisonnements par des corps méthémoglobinisants et pour les dérivés azotés, cyanogénés, etc., voir les traités de toxicologie et de médecine légale. Dans le cadavre, la méthémoglobine peut, au début de la putréfaction, se transformer de nouveau en hémoglobine et échapper à la recherche. Certains corps méthémoglobinisants peuvent produire *in vitro* la transformation de l'hémoglobine sans détruire les globules rouges. D'autres sont incapables de produire la méthémoglobine *in vivo* mais peuvent la produire *in vitro*. Nous étudierons ces questions au chapitre XVI (Anémies toxiques).

(2) Par exemple le lapin intoxiqué par le nitrite de sodium à la dose de 0 gr. 15 par kilog. Voir Hénocque, *l. c.*; Hüfner et Otto, *Zeitschrift f. phys. Chemie*, VII, 1882. — Otto, *Pflüger's Archiv*, XXXI, 1883.

méthémoglobine présente une bande caractéristique entre C et D, dans le rouge ($\lambda = 633$), deux autres ayant à peu près la situation des deux bandes de l'oxyhémoglobine, et une quatrième, très large, entre E et F, mais qui n'est visible que dans les solutions très étendues.

Dans les solutions rendues alcalines en ajoutant une goutte d'ammoniaque, la bande caractéristique de gauche (rouge) disparaît, ainsi que la large bande de droite ; les deux bandes médianes persistent et une nouvelle apparaît dont le centre correspond à $\lambda = 603$ (dans le rouge).

Les préparations microscopiques de cristaux donnent les trois bandes caractéristiques de la méthémoglobine en solution acide ; le spectre de la méthémoglobine alcaline ne semble pas avoir été observé encore dans les cristaux.

Hématine. — L'hématine est le noyau coloré, ferrugineux, de l'oxyhémoglobine. L'oxyhémoglobine, en présence des acides minéraux et des bases fortes, se décompose en hématine et en globine. On peut obtenir l'hématine, en décomposant l'oxyhémoglobine par la chaleur et en dissolvant l'hématine produite par l'alcool acidifié. L'hématine produite de cette façon est une poudre cristalline insoluble dans l'alcool et dans l'eau, mais soluble dans les liquides légèrement alcalinisés de même que dans l'alcool acidulé. Les solutions acides sont de couleur brune, les solutions alcalines sont dichroïques, rouges à la lumière transmise. Les spectres d'absorption sont différents suivant la réaction du milieu : le spectre de l'hématine en solution alcoolique acide présente une bande de forte intensité dans le rouge et trois autres bandes entre D et E. Les solutions alcalines montrent une seule bande, large, et située presque entièrement dans le rouge (1).

L'hématine se transforme en hémine ou chlorhydrate d'hématine par l'action de l'acide acétique en présence du chlorure de sodium. Les agents réducteurs la transforment en hémochromogène, réaction comparable à celle de la réduction de l'oxyhémoglobine. Mais le vide absolu ne lui enlève pas d'oxygène, l'oxyde de carbone non plus. Les acides minéraux concentrés lui enlèvent tout son fer à l'état de sel ferreux et avec formation d'hématoporphyrine.

L'hématine existe dans l'organisme ; on la trouve normalement dans le tube digestif où elle résulte de l'action du suc gastrique sur les pigments sanguins contenus dans la viande ingérée. Sa présence, en quantité plus abondante dans les excreta peut provenir d'une hémorragie nasale ou pulmonaire dont le sang a été en partie ingéré.

Au cours de certaines intoxications, on peut trouver de l'hématine dans le sang (intoxication par le nitrobenzène, par l'hydroxylamine, etc.) ou dans les urines (intoxications par l'acide sulfurique, etc.). Dans les hémoglobinuries, on peut trouver de l'hématine dans les urines si l'acidité de ce liquide a été suffisante pour la libérer. On la recherche à l'aide de ses caractères spectroscopiques en solution acide et alcaline ; on peut la transformer par réduction en hémochromogène, le spectre de l'hémochromogène étant plus facile à reconnaître. On la caractérise aussi par la recherche des cristaux d'hémine, qu'elle donne, comme l'hémoglobine, par l'acide acétique, en présence du chlorure de sodium.

(1) D'après les recherches de *Piettre et Vila* (*C. R. de l'Ac. des sc.*, 11 décembre 1905), l'hématine cristallisée, obtenue en partant de cristaux d'oxyhémoglobine pure, donnerait en solution alcaline, outre la bande classique ($\lambda = 606$), deux autres bandes ($\lambda = 534$ et $\lambda = 494$). Les cristaux ont la même forme que les cristaux d'hémine.

L'hématine se forme dans toutes les circonstances où du sang se détruit. Dans les pièces anatomiques conservées dans la plupart des liquides communément employés, le pigment sanguin est transformé en hématine acide et prend un aspect brunâtre. Aujourd'hui, pour la conservation des pièces anatomiques, on cherche à favoriser la production de l'hématine neutre ou faiblement alcaline afin de conserver aux pièces la teinte rouge de l'hémoglobine.

L'hématine est très stable ; c'est ce qui explique qu'elle puisse persister si longtemps dans les taches de sang. Lorsque le sang se dessèche sans putréfaction, elle peut rester inaltérée pendant des années ; pendant la putréfaction, l'hématine peut se détruire en abandonnant son fer. Elle est beaucoup moins sensible à l'action de la chaleur et supporte sans dommage une température de 150°.

Hémine ou chlorhydrate d'hématine. — L'hémine ou chlorhydrate d'hématine, est, au point de vue de l'étude microscopique, le plus intéressant des dérivés de l'hémoglobine, à cause de ses cristaux caractéristiques et facile à produire. Ils peuvent être obtenus en faisant évaporer doucement une goutte de sang additionnée d'acide acétique. Dans cette réaction, faite pour la première fois par *Teichmann* (1) c'est le sérum sanguin qui fournit le chlorure de sodium nécessaire. Mais il vaut mieux ajouter le chlorure de sodium au sang desséché, comme nous l'avons indiqué plus haut. Nous ne reviendrons pas sur cette réaction ni sur la forme des cristaux et nous donnerons ici des renseignements complémentaires sur les différentes sortes d'hémines.

Fig. 135. — Sang humain. Cristaux d'hémine réguliers obtenus avec l'iodure de sodium et l'acide acétique. 375 diam.

La plupart des auteurs, comparant le sang de différentes espèces animales, ont considéré *l'hématine* comme une substance unique, toujours semblable à elle-même. D'après certaines recherches (2) au contraire, le teneur en fer varierait d'une espèce à l'autre. L'hématine ne serait donc pas un corps unique et, par suite, les cristaux qui en dérivent pourraient aussi ne pas être identiques d'un animal à l'autre. Pourtant, si on examine au microscope les cristaux d'hémine obtenus, dans les mêmes conditions, avec le sang des espèces animales les plus variées (mammifères, batraciens, annélides, etc.), on n'observe aucune

(1) Teichmann, *Zeitschrift f. rat. Med.*, VIII, 1857.
(2) Cazeneuve et Breteau, *J. de pharm. et de chimie*, 6e sér., IX, 1899.

différence appréciable. Les cristaux de Teichmann obtenus avec le sang des embryons ont aussi le même aspect.

La cristallisation de l'hémine peut être troublée par des circonstances accessoires : chauffage trop élevé ou trop prolongé, présence de substances étrangères (alcalis forts, sulfate d'ammoniaque, etc.). C'est dans ces cas qu'on peut voir apparaître des formes irrégulières ou incomplètes (1). D'après *Cazeneuve* et *Breteau*, un simple chauffage prolongé de l'hématine en solution aqueuse suffit à modifier sa composition chimique et sa teneur en fer ; il n'est donc pas étonnant que les mêmes circonstances puissent influencer la formation des cristaux d'hémine ; mais jusqu'ici, on n'a pas encore démontré une modification constante de la forme en rapport avec une modification de composition chimique.

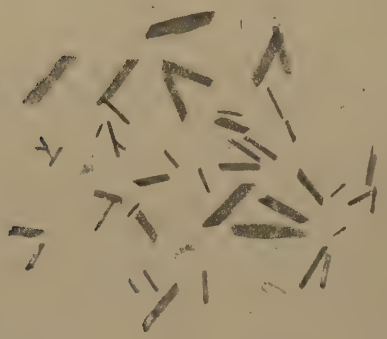


Fig. 136. — Cristaux d'hémine obtenus avec du sang de cobaye desséché depuis 15 ans et du bromure de sodium. 750 diam.

Cette question est tout à fait distincte de celle des variétés d'hémine, le chlore pouvant être remplacé par le brome ou l'iode, comme nous le verrons un peu plus loin.

Le formol ne trouble pas la réaction ; le sang fixé dans les tissus par le formol donne encore souvent de beaux cristaux de Teichmann.

La question de savoir pendant combien de temps les cristaux d'hémine peuvent être obtenus dans le cadavre de l'homme ou des animaux est une question importante qui a été souvent posée. Lorsque la putréfaction a été empêchée par quelque circonstance, cette durée peut être très grande ; du sang desséché donne la réaction pendant dix, vingt ans et plus. Il semble cependant que cette durée n'est pas illimitée et *Kobert* a recherché sans succès les cristaux de Teichmann dans des momies égyptiennes. La formation des cristaux peut être empêchée par l'exposition longue du sang desséché à la lumière solaire.

La réaction des cristaux d'hémine permet de déceler des quantités minimes ; la plus petite quantité de sang décelable serait voisine de 0 mgr. 025 (2).

(1) En présence du sulfate d'ammoniaque, il se forme dans la préparation des cristaux de soufre qui ont été pris quelquefois pour une combinaison de l'hématine.

(2) Kobert, *l. c.*, p. 59.

Les taches produites par les excréments d'insectes piquants (punaises, puces et qui, par leur aspect extérieur, peuvent parfois faire croire à des taches de sang, peuvent naturellement contenir de l'hématine. Malgré des affirmations contraires, les excréments de la mouche domestique n'en donnent pas, d'après les recherches de *Kobert*, sauf, bien entendu dans les cas où les mouches absorbent du sang par le tube digestif. On comprend que le résultat sera tout à fait différent si les mouches ont été capturées, par exemple, au voisinage d'un abattoir.

Fig. 137. — Cristaux d'hémine obtenus avec du sang d'homme et du bromure de sodium. D'après Kobert.

La réaction des cristaux d'hémine est une bonne méthode pour la recherche du sang dans les fèces de l'homme. On dessèche un échantillon qu'on traite avec de l'acide sulfurique ; l'extrait est étendu d'eau ; l'hématine se précipite ; on ajoute du chlorure ou de l'iodure de sodium et on chauffe avec de l'acide acétique. Les fèces normales peuvent contenir de l'hématine, mais en quantité si minime que la présence d'une hémorragie ne peut passer inaperçue. La réaction peut servir aussi à mettre le sang en évidence dans les urines. La réaction des cristaux peut aussi être employée à l'analyse des préparations pharmaceutiques commerciales tirées du sang et qui annoncent un produit hémoglobique.

Fig. 138. — Cristaux d'hémine bromhydrique obtenus avec un caillot de sang de lapin fixé dans le formol et conservé depuis 2 ans dans l'alcool. 400 diam.

Hémine iodhydrique, hémine bromhydrique. — Le chlore peut être remplacé dans la réaction par l'iode ou par le brome. Il y a donc diverses hémines considérées comme des éthers plutôt que comme des sels vrais. On utilisera le bromure de sodium ou l'iodure de sodium. Ce dernier paraît particulièrement utile pour produire des cristaux d'hémine (1). Il faut employer un iodure et non l'iode en nature, qui, au contraire, empêche la for-

(1) L'emploi des iodures a déjà été indiqué par Teichmann. Les cristaux d'hémine bromhydrique et iodhydrique peuvent être obtenus en partant de l'hémoglobine cristallisée ou du sang privé de chlorure de sodium ; leur production n'est donc pas due à la petite quantité de chlorure contenue dans le sang.

mation des cristaux. Ces cristaux ont la même forme que les cristaux d'hémine chlorhydrique, mais leur couleur diffère suivant l'acide : ils sont brun clair avec le chlore, brun rouge avec le brome, noirâtres avec l'iode. Avec le fluorure de sodium, on n'obtient pas de cristaux.

Fig. 139. — Cristaux d'hémine chlorhydrique obtenus avec un fragment de poumon d'homme conservé depuis un an dans le formol. 750 diam.

A côté des divers cristaux d'hémine, il faut placer d'autres dérivés cristallisés de l'hématine sur la constitution chimique desquels nous ne possédons encore que très peu de renseignements.

En chauffant de l'hématine ou du sang pendant quelques secondes à la flamme avec une solution de certains acides dans la glycérine (tartrique, oxalique, borique, formique, etc.), on observe au microscope de nombreux cristaux, très petits, bacilliformes, qui sont probablement des dérivés hématiques de ces acides ; ce sont les cristaux de *Strzyzowski* et de *Axenfeld*. Ces cristaux sont probablement voisins de ceux qui ont été décrits par *Cazeneuve* (1) en 1875 et qui ont été obtenus ensuite par *Cloetta* et par *Kobert*, en chauffant une solution alcoolique d'hématine contenant un peu d'acide sulfurique, avec de l'alcool chlorhydrique.

Fig. 140. — Cristaux d'hémine obtenus avec du sang de cobaye desséché depuis 15 ans, au moyen du chlorure de sodium et de l'alcool azotique 400 diam.

Teichmann avait déjà obtenu des cristaux d'hémine en remplaçant l'acide acétique par de l'alcool acidifié avec de l'acide sulfurique. En remplaçant l'acide acétique dans la réaction, par de l'alcool à 90° contenant de l'acide sulfurique, de l'acide azotique, tartrique, picrique, oxalique, etc., on obtient en effet, avec du sang desséché, et en présence du chlorure de sodium, de petits cristaux rhombiques qui ressemblent beaucoup aux cristaux d'hémine habituels (*Wachholz*, *Kobert*) (2).

En chauffant le sang avec de l'acétone et de l'acide chlorhydrique, *Nencki* (3) a obtenu des cristaux un peu différents des cristaux d'hémine habituels, qu'il a décrits sous le nom de cristaux d'acéto-

(1) Cazeneuve, *Recherches de chimie médicale sur l'hématine*, Thèse Paris, 1876.
(2) Kobert, *l. c.*, p. 66. — Cloetta, *Arch. f. exp. Path. u. Pharmakol.*, XXXVI, 1895.
(3) Nencki et Zaleski, *Zeitschrift f. phys. Chemie*, XXX, 1900.

nohémine. *Kobert* a obtenu des cristaux analogues en remplaçant l'acide chlorhydrique par l'acide bromhydrique.

Hémochromogène. — L'hémoglobine réduite se décompose à l'abri de l'air, en présence des alcalis, en une matière albuminoïde (globine) et en hémochromogène. L'hémochromogène est le fragment ferrugineux de l'hémoglobine réduite. Il est à l'hémoglobine ce que l'hématine est à l'oxyhémoglobine ; aussi l'appelle-t-on parfois hématine réduite. On peut le former par réduction de l'hématine au moyen du sulfhydrate d'ammoniaque ; mais on l'obtient en général, à l'état de précipité pulvérulent violacé, en soumettant l'hémoglobine à l'action des alcalis à 100° et à l'abri de l'air, ou en faisant agir à froid des alcalis concentrés sur l'oxyhémoglobine. Ainsi préparé, il a l'aspect d'une poudre cristalline insoluble dans l'eau, mais soluble dans les alcalis dilués et donnant au liquide une teinte rouge. Il est très instable et se transforme à l'air en hématine par absorption d'oxygène. Les acides dilués, en solution alcoolique, lui enlèvent son fer et le transforment en hématoporphyrine. L'oxyde de carbone peut former avec lui une combinaison.

Fig. 141. — Cristaux d'hémochromogène du sang du cobaye. D'après Kobert.

L'hémochromogène est important à connaître à cause de son spectre caractéristique et de ses cristaux, faciles à obtenir avec des traces de sang. Les solutions alcalines montrent, à l'examen spectroscopique, deux bandes, dont l'une, située à peu près exactement entre D et E est la plus nette et persiste seule dans les solutions très diluées. Cette réaction est très sensible et très caractéristique ; une solution d'hématine obtenue avec une tache de sang, et qui ne donne pas de spectre suffisant, pourra donner, par addition de sulfhydrate d'ammoniaque, un spectre caractéristique dû à l'hémochromogène.

Pour obtenir des cristaux, on dépose sur une lame de verre une goutte de sang (défibriné) ; on ajoute une goutte de pyridine, puis une goutte de sulfhydrate d'ammoniaque et on recouvre d'une lamelle. On obtient des cristaux en aiguille, en gerbes, en touffes, colorés en rouge orangé. Pour avoir des préparations durables, le sang est mélangé sur le porte-objet avec de la pyridine ; on l'entoure d'un anneau de baume de Canada épais et on recouvre d'une lamelle très large. Le baume, introduit pendant la formation même des cristaux, empêche l'accès de l'air et préserve ainsi les cristaux d'une destruction. Ces préparations donnent le spectre caractéristique de l'hémochromogène ; elles peuvent se conserver plusieurs années. Par l'addition de sulfhydrate d'ammoniaque, les cristaux se produisent plus vite, mais ils ne sont pas si gros et ils se détruisent plus rapidement. Les cristaux peuvent se produire avec la pyridine seule (1).

On peut aussi produire les cristaux d'hémochromogène avec du sang desséché, par conséquent, en partant de l'hématine. Les traces de sang sont délayées avec une solution de soude et on opère comme précédemment. On peut, à la suite de leur transformation à l'air, obtenir des cristaux d'hémine en partant des cristaux d hémochromogène.

(1) Kobert, *l. c.*, p. 80.

Hématoporphyrine. — L'hématoporphyrine est le fragment chromogène de l'hémoglobine, privé de son fer. On l'obtient par action des acides dilués sur l'hémochromogène, ou des acides concentrés sur l'hématine ou sur l'hémine ; c'est en général en partant de l'hémine qu'on la prépare. Elle se présente sous l'aspect d'une poudre foncée, violacée, insoluble dans l'eau, soluble dans l'alcool éthylique. Elle est soluble dans les acides minéraux et dans les alcalis et donne avec eux des solutions fluorescentes. Les solutions alcooliques ont une fluorescence rouge, qui vire à l'orangé par alcalinisation ou en pourpre par addition d'acide. Les solutions acides donnent au spectroscope, une bande large et intense entre D et E, une autre plus faible, entre C et E. Les solutions alcalines donnent quatre bandes, une faible entre C et D, deux faibles entre D et E, une plus forte entre E et F.

L'hématoporphyrine s'unit aux acides minéraux en donnant des sels cristallisables (chlorhydrate). Chauffée à sec, elle dégage des vapeurs de pyrrol. Chauffée doucement avec de l'acide nitrique fumant, elle passe au vert, puis au bleu et au jaune. Oxydée par l'acide chromique, elle fournit deux acides hématiques, obtenus aussi de la même façon en ajoutant de l'hématine, et qui sont des dérivés pyrroliques. Ces différentes réactions de l'hématoporphyrine la rapprochent de la bilirubine.

Fig. 142. — Cristaux de chlorhydrate d'hématoporphyrine D'après Nencki et Sieber.

Des traces d'hématoporphyrine ont été quelquefois trouvées dans l'urine normale de l'homme et des animaux. Cependant, ce n'est pas elle qui se forme, *in vivo*, au cours de la destruction de l'hémoglobine, mais un corps très voisin, la *bilirubine*. La bilirubine formée dans l'organisme par la destruction de l'hémoglobine avec libération du fer, a la même composition centésimale que l'hématoporphyrine ; elle fournit, par oxydation, les mêmes acides hématiques ; mais elle n'a pas encore été obtenue *in vitro*.

L'hématoporphyrine présente aussi une grande analogue de structure avec la phylloporphyrine retirée de la chlorophylle. Il semble aujourd'hui que les différences fonctionnelles qui existent entre l'hémoglobine et la chlorophylle sont dues surtout à l'élément métallique spécial qui entre dans leur composition (fer pour le pigment sanguin, magnésium pour le pigment végétal) ; le support serait commun et constitué par quatre noyaux dérivés du pyrrol. Il existe une mésoporphyrine, intermédiaire à la phylloporphyrine et à l'hématoporphyrine. Ces trois substances ont des caractères spectroscopiques très semblables (1).

A l'état normal, l'hématoporphyrine n'a été trouvée qu'à l'état de traces dans l'urine de l'homme et du lapin. Mais elle peut apparaître en quantités plus appréciables dans les urines pathologiques, soit au cours d'hémorragies intestinales, soit dans les maladies du foie, soit dans certaines intoxications (plomb, sulfonal, trional), en particulier, après l'usage prolongé du sulfonal. Les urines ont alors une teinte vineuse. Une partie du pigment se précipite avec le sédiment urinaire et peut se trouver à l'état de chromogène que l'air et la lumière transforment ensuite en hématoporphyrine.

(1) Voir Tiffeneau, *l. c.*, Kobert, *l. c.* et Breteau, *J. de Pharmacie et de Chimie*, 1914.

Hématoïdine. — L'hématoïdine est un pigment sanguin découvert par *Virchow* dans les vieux foyers hémorragiques et qui se présente sous formes d'aiguilles ou de tablettes rhombiques de couleur orangée. C'est un corps très voisin de l'hématoporphyrine qui se forme *in vivo* dans les épanchements sanguins. Contrairement aux pigments d'origine sanguine décrits plus haut, l'hématoïdine ne possède aucun spectre d'absorption caractéristique. Alors que l'hématoporphyrine ne cristallise pas *in vivo*, l'hématoïdine montre au contraire une grande tendance à se précipiter sous une forme cristalline. Ces cristaux ont été trouvés dans un grand nombre d'organes, mais surtout dans le cerveau. Divers auteurs on pu observer leur formation *in vitro*

D'après la plupart des auteurs, l'hématoïdine serait identique à la bilirubine, ou tout au moins, elle aurait la même composition centésimale (1). Dans les exsudats hémorragiques traumatiques sous-cutanés, on peut trouver, au bout de quelques jours, des cristaux d'hématoïdine.

Comme nous l'avons vu plus haut, il existe d'étroites relations entre les dérivés hémoglobiques et la chlorophylle. Il n'est pas sans intérêt de signaler encore que l'hématoïdine ressemble à une matière colorante rouge qui a été trouvée dans beaucoup de plantes et décrite sous le nom de *carotine*.

ORIGINE ET TRANSFORMATIONS DE L'HÉMOGLOBINE.

On sait très peu de chose sur l'origine de l'hémoglobine et sur la manière dont l'organisme en réalise la synthèse. L'existence, dans le noyau coloré, de composés pyrroliques, a fait penser que ce sont surtout les végétaux chlorophylliens, riches en dérivés pyrroliques, qui, soit directement, soit indirectement, par les herbivores, apportent à l'organisme ce fragment de la molécule hémoglobique. Le fer est apporté chaque jour en petite quantité par les aliments (2). Quant à la manière dont l'organisme introduit le fer dans la molécule et réalise la synthèse de l'hémoglobine, elle nous est totalement inconnue. Certains faits permettent de supposer que l'organisme utilise de préférence des fragments tout formés, ceux qui lui sont apportés par les pigments naturels (hémoglobine musculaire de l'alimentation carnée, chlorophylle des végétaux). Il est même possible qu'une partie de l'hémoglobine provenant des globules rouges

(1) Si on chauffe un calcul biliaire contenant de la bilirubine avec du chloroforme et si on évapore avec précaution le filtrat sur le porte-objet, on obtient de petits prismes rhombiques de couleur orangée qui paraissent identiques aux cristaux d'hématoïdine.

(2) Surtout par la viande, les œufs et les féculents. Voir : Dastre, article Fer *in Dictionnaire de physiologie* de Ch. Richet. Bunge, *Lehrbuch der physiologischen und path. Chemie* et *Zeitschrift f. Biologie*, XLV, 1904. — Lapicque, Thèse sc., Paris, 1897, et *Exposé de titres*, Paris, 1908. — Dastre et Floresco, *Archives de physiologie*, 1898. — Lambling, *Biochimie*. — Abderhalden, *Zeitschrift f. Biologie*, XXXIX, 1900. D'après Lapicque, la quantité de fer apportée par les aliments chez l'homme est de 15 à 20 milligrammes par vingt-quatre heures et par kilogramme. Voir aussi pour le cycle du fer, chap. x et xvi.

détruits chaque jour dans l'organisme ne se transforme pas en bilirubine et soit utilisée à l'état de fragment ferrugineux pour la fabrication du pigment de nouveaux globules (1).

Transformations de l'hémoglobine dans l'organisme. Relations avec les pigments biliaires. — Nous savons cependant aujourd'hui que l'hémoglobine se transforme normalement dans l'organisme en fer et en bilirubine. Cette destruction continue correspond, en vingt-quatre heures, à 10 ou 12 grammes d'hémoglobine, mettant en liberté environ 4 centigrammes de fer (2). Ce fer libéré s'accumule surtout dans le foie (3). L'origine hémoglobique de la bilirubine résulte des faits suivants : on produit une augmentation de la bilirubine éliminée par la bile en injectant une solution d'oxyhémoglobine dans les veines d'un chien ou en produisant *in vivo* un certain degré d'hémolyse par injection d'agents hémolytiques (4). On trouve de la bilirubine dans les cavités et les tissus dans lesquels du sang épanché a séjourné (5).

L'hématoïdine, pigment sanguin des vieux foyers hémorragiques, a été identifiée à la bilirubine ; elle en est, en tout cas, très voisine, de même que l'hématoporphyrine. L'origine hémoglobique de cette dernière substance est certaine, puisqu'on peut l'obtenir *in vitro*, et hématoporphyrine et bilirubine ont la même composition centésimale et des réactions communes : elles donnent par chauffage avec l'acide nitrique fumant la coloration verte virant au bleu et au jaune ; elles fournissent les mêmes acides hématiques par oxydation au moyen de l'acide chromique ; elles ont les mêmes propriétés hémolytiques en présence de la lumière (6). Ainsi, l'oxyhémoglobine, perdant sa globine et son fer, se transforme en bilirubine, et cette dégradation, *in vivo*, paraît se faire sans stade intermédiaire.

(1) Pour l'origine première de l'hémoglobine dans l'embryon, voir ch. x.

(2) Cette destruction correspondrait ainsi à près de 100 cc. de sang. Elle est évaluée par la quantité de bile sécrétée par jour par un sujet atteint de fistule biliaire.

(3) Le fer contenu dans le foie n'est pas entièrement d'origine hémoglobique ni destiné en totalité à l'hématopoièse. Cette réserve de fer hépatique existe aussi chez des animaux dont le sang est dépourvu d'hémoglobine (Dastre). Chez les végétaux, le fer, bien que n'entrant pas dans la composition de la chlorophylle, a une influence sur la production de ce pigment.

(4) Dans ces circonstances, on peut trouver, dans les cellules hépatiques, des cristaux de dérivés hémoglobiques que Browicz a vu jusque dans l'intérieur du noyau (Fiessinger, *Revue générale d'histologie*, IV, 1911 ; Asvadourova, *Archives d'An. micr.*, XV, 1913).

(5) Quand on injecte dans le système vasculaire de l'eau distillée ou une substance hémolytique comme la toluylène-diamine, on produit de cette façon de l'hémoglobinémie ; suivant la quantité d'hémoglobine dissoute, on obtient une augmentation de la quantité de pigment dans la bile (pléiochromie), ou une élimination d'hémoglobine par la bile ; enfin, si le foie ne peut suffire à transformer ou à éliminer le pigment sanguin, il se produit de l'hémoglobinurie. Dans ces cas, le foie s'enrichit en fer.

(6) Voir Tiffeneau, article Hémoglobine, *in* Gilbert-Weinberg, *Traité du sang*.

La transformation de l'oxyhémoglobine se fait normalement dans le foie et dans la rate, mais les divers tissus paraissent aussi pouvoir l'effectuer, s'il y a eu hémolyse préalable, soit *in situ*, soit dans le sang.

Les masses amorphes ou cristallines décrites par *Virchow* (1) dans les infarctus hémorragiques sous le nom d'hématoïdine ont les mêmes propriétés et la même composition que la bilirubine. La transformation de l'hémoglobine en bilirubine a été réalisée expérimentalement par injections sous-cutanées ou intra-péritonéales de sang à des animaux ; elle aurait même été réalisée *in vitro* (2).

Lorsqu'une hémorragie se produit dans une cavité séreuse, la bilirubine peut apparaître, exactement comme lorsque le sang s'est répandu dans le tissu conjonctif interstitiel. Le fait a été bien étudié dans les hémorragies méningées (3) ; on l'a montré aussi dans l'hémothorax traumatique (4).

Dans les faits que nous venons de rappeler, la bilirubine est formée sur place, aux dépens de l'hémoglobine des globules rouges épanchés dans les tissus ou les cavités. Les travaux de *Widal, Abrami et Brulé* ont montré que la bilirubine peut se produire dans le système vasculaire, en dehors de toute intervention du foie. Elle donne lieu ainsi à l'apparition d'ictères spéciaux, très distincts des ictères d'origine hépatique et qui sont dus à une destruction des globules rouges et à une fabrication de bilirubine aux dépens de l'hémoglobine diffusée. Ce sont les *ictères hémolytiques* qui peuvent être congénitaux ou acquis (5), et qui sont accompagnés parfois d'une fragilité particulière des hématies (6).

Dans l'hémoglobinémie qui précède certaines hémoglobinuries paroxystiques d'origine paludéenne ou toxique, on a également observé l'apparition d'*ictères* dus à la formation intravasculaire de bilirubine aux dépens de l'hémoglobine diffusée.

(1) Virchow, *Virchow's Archiv*, I, 1847.

(2) La tache verte abdominale des cadavres est due aussi à la biliverdine, résultat de l'oxydation de la bilirubine ; mais elle provient directement des pigments biliaires transsudés de la vésicule biliaire et de l'intestin.

(3) Froin, Thèse Paris, 1904.

(4) Guillain et Troisier, *Semaine médicale et Revue de médecine*, 1909.

(5) Voir Chauffard, *Semaine médicale*, 29 janvier 1908 ; Chauffard et Troisier, *in* Gilbert et Weinberg, *Traité du sang*, I, p. 227 ; Widal, Abrami et Brulé, *XIIe Congrès français de médecine*, Lyon, 1911 ; M. Brulé, Thèse, Paris, 1909 ; *Recherches récentes sur les Ictères*, Paris, Masson, 1922 et Ictères hémolytiques in *Traité de Pathologie* de Sergent.

(6) Voir ch. ix, résistance globulaire, et ch. xvi. L'absence de lésions du foie et des voies biliaires contraste avec l'intensité de l'anémie et des lésions sanguines.

Pigment ferrugineux. Réactions microchimiques du fer. — A côté de la bilirubine, produit bien défini, la destruction des globules rouges dans les foyers hémorragiques donne lieu à la formation d'autres produits pigmentaires, dérivés de l'hémoglobine et qui se distinguent de la bilirubine par ce fait qu'ils possèdent les réactions micro-chimiques du fer (1). Il ne s'agit plus là de produits bien caractérisés mais de mélanges, dans lesquels, à côté de dérivés hématiques incomplètement dégradés, se trouvent des sels organiques de fer, des oxydes de fer, et peut-être du fer métallique. Cet ensemble de substances forme un pigment de couleur fauve, auquel *Neumann* (2) avait donné autrefois le nom d'*hémosidérine* et qu'on a souvent désigné de nos jours sous les noms de *pigment ocre*, de *rubigine* (3) ou plus simplement, de *pigment ferrugineux*, dénomination qui ne préjuge pas de sa nature (4).

Le pigment ferrugineux donne en effet les deux réactions microchimiques du fer : celle du bleu de Prusse et celle du sulfhydrate d'ammoniaque. La réaction du bleu de Prusse se produit par l'action simultanée ou successive d'une solution de ferrocyanure de potassium et d'une solution faible, à 2 p. 100, d'acide chlorhydrique. Les grains de pigment prennent une teinte bleu foncé. On peut faire la réaction sur les coupes — ou même plonger de petits fragments de tissu dans les réactifs ; la réaction est, dans ce cas, naturellement plus lente.

Technique de la réaction du fer. — Le mieux est de produire la réaction sur les coupes. On fixe par l'alcool ou les mélanges bichromate-formol, chromo-osmique ; on fait l'inclusion à la paraffine. Les coupes, collées sur lames, sont immergées pendant 30 à 50 minutes dans une solution de ferrocyanure de potassium à 2 p. 100, puis dans une solution d'acide chlorhy-

(1) Le fer, en combinaison organique, tel qu'il se trouve par exemple, dans l'hématine, échappe aux réactions micro-chimiques et ne donne ni la réaction du bleu de Prusse ni celle du sulfure d'ammonium. Seul le fer minéral, libéré ou sous forme de combinaison saline (chlorure, oxalate, etc.) ou d'albuminate, donne ces réactions. Il existe cependant des produits intermédiaires, tels que l'hématogène de Bunge, qui donnent la réaction du bleu de Prusse, mais très faiblement et après plusieurs heures de contact. Certains aliments contiennent des combinaisons de ce genre. (Voir pour l'hématogène de l'œuf de poule, ch. x). Pour faciliter la réaction microchimique, on a souvent proposé d'attaquer la combinaison organique du fer par un acide fort avant de faire agir le ferrocyanure.

(2) Neumann, *Virchow's Archiv*, CXI, 1888 ; CLXI, 1900 ; CLXX, 1902 ; CLXXVII, 1904 ; CXCVII, 1910 ; — Hofmann, *Virchow's Archiv*, CLI, 1898 ; — Quincke, *Deutsches Archiv f. klin. medicin.*, XXXIII, 1883, *und Specielle Pathologie de Nothnagel.*

(3) Auscher et Lapicque, *Archives de Physiologie*, 1896 ; — Regaud, *Soc. de Biologie*, 10 avril et 15 mai 1897 ; — Duvernay, Th. Lyon, 1905. — Lapicque, Th. Sciences, Paris, 1897 et *Exposé de titres*, Paris, 1908.

(4) D'après les recherches de *Lapicque*, le pigment ferrugineux est constitué par un hydrate ferrique.

drique à 2 p. 100 (1). On lave ensuite pour faire disparaître toute trace d'acide et on colore les noyaux par le carmin aluné ; on déshydrate et on monte au baume. On peut aussi colorer les noyaux par la safranine. Il est bon de suivre la réaction au microscope sur une coupe simplement montée dans de la glycérine que l'on additionne de moitié son volume de la solution chlorhydrique.

Le pigment ferrugineux prend une teinte noire sous l'action d'une solution de sulfhydrate d'ammoniaque, par formation de sulfure de fer. Il est bon que la solution soit un peu vieillie, qu'elle ait pris une teinte jaune. On peut faire la réaction sur coupes ou colorer des fragments. Cette réaction est moins sensible que celle du bleu de Prusse, mais surtout, elle n'est pas caractéristique du fer, car d'autres métaux (argent, plomb, mercure), donnent un sulfure noir avec le sulfhydrate d'ammoniaque. Enfin, ce pigment coloré en noir ne se distingue plus des mélanines. La réaction du sulfhydrate d'ammoniaque est donc une réaction de contrôle, qui ne peut suffire à elle seule (2).

Presque toujours, le pigment ferrugineux est intracellulaire ; on le trouve dans les leucocytes, les cellules conjonctives ou endothéliales, les cellules médullaires dans la moelle osseuse, etc. Cela tient, en effet, à ce que les globules rouges morts, en voie de destruction, sont activement phagocytés par ces cellules avant d'être complètement transformés. Dans les cellules, par la réaction du bleu de Prusse, le pigment apparaît sous forme de granulations bleues de différentes tailles ou sous forme d'une teinte bleue diffuse ; mais il peut exister aussi en dehors des cellules, sous la forme d'amas plus volumineux, à contours arrondis et irréguliers.

Étapes de la production du pigment. — On a suivi expérimentalement les différentes étapes de la production du pigment, soit dans des foyers hémorragiques provoqués, soit en injectant des solutions d'hémoglobine ou du sang dans les tissus. Dans les foyers hémorragiques, l'arrivée des leucocytes est assez rapide et au 2e ou 3e jour, on les trouve en train de phagocyter les globules rouges. L'activité des cellules conjonctives entre aussi en jeu et c'est dans leur intérieur qu'on trouve surtout, d'abord les globules rouges, puis le pig-

(1) On peut aussi, dans un premier temps, démasquer le fer par le procédé de *Macallum*, en traitant la coupe par l'alcool acide (alcool à 95° additionné de 4 p. 100 d'acide sulfurique) (voir Asvadourova, Ass. des An., 11e réunion, Nancy, 1909). La réaction du bleu de Prusse, qui est la meilleure réaction microchimique du fer, semble pouvoir être employée après la plupart des réactifs fixateurs.

(2) On a recommandé diverses réactions microchimiques du fer : coloration bleue par le ferrocyanure et l'acide chlorhydrique, coloration rouge par le sulfocyanure de potassium suivi de l'action de l'acide chlorhydrique. — Coloration bleu foncée ou noire par l'hématoxyline (Macallum), coloration brun foncé par la brésiline qui colore les noyaux en rougeâtre (Mawas, *Soc. de Biologie*, 22 février 1919). *Mawas* a recommandé le rouge d'alizarine. Fixation au formol à 10 p. 100 ; fer démasqué par l'alcool acidifié (SO^4H^2, 2 à 4 p. 100). Colorer 5 à 15 minutes dans une solution aqueuse de rouge d'alizarine à 1 p. 200. La coupe est ensuite portée dans un bain d'eau contenant des traces de chlorure de calcium. Eau. Déshydratation par les alcools, xylol, baume. Le fer est coloré en brun noir, les noyaux en violet rouge, le fond de la préparation en rose. (Mawas, *S. de Biologie*, 25 janvier 1919.) Voir aussi Abderhalden, *Handbuch der Bioch. Arbeitsmethoden ;* — Macallum, *Ergebnisse der Physiologie*, VII, 1908 ; — Hueck, *Ziegler's Beiträge*, LIV, 1912.

ment ferrugineux qui en dérive. C'est surtout dans le péritoine qu'on peut suivre le mieux les étapes de cette transformation — en injectant du sang ou des globules rouges hétérogènes dans la cavité péritonéale d'un cobaye ou d'un rat et en suivant la phagocytose des globules rouges et la formation du pigment ferrugineux à l'intérieur des cellules endothéliales.

Dans la paroi des foyers hémorragiques, dans le tissu conjonctif, le pigment a une certaine tendance à diffuser progressivement ; c'est qu'il est porté par les leucocytes qui le transportent dans les vaisseaux lymphatiques voisins. De là, il arrive dans les ganglions, de la même manière que les corps phagocytés introduits par tatouage par exemple à l'extrémité d'un membre, arrivent dans les ganglions de la racine du membre.

Le pigment ferrugineux ne se produit pas seulement dans les foyers hémorragiques. Il se forme également dans tous les cas où les globules rouges du sang se détruisent (intoxication par le chlorate de potasse, la toluylène-diamine, — surchauffage — brûlures étendues, etc.), et où de l'hémoglobine est mise en liberté dans le plasma du sang circulant (*hémoglobinémie* ou *méthémoglobinémie*). La destruction de l'hémoglobine non éliminée donne lieu, d'une part, à la formation intravasculaire de bilirubine, d'autre part, au dépôt du pigment ferrugineux dans certains organes ; c'est la *sidérose*, que l'on trouve aussi dans les ictères hémolytiques.

Le dépôt du pigment ferrugineux se fait surtout dans le foie. Il semble apporté d'abord par les leucocytes qu'on trouve, chargés de pigment, dans les capillaires intra-hépatiques. Un peu plus tard, les cellules de Kupffer (1) donnent la réaction du bleu de Prusse ; les cellules hépatiques elles-mêmes finissent par s'imprégner du pigment, de sorte que lorsque les phénomènes ont été intenses et prolongés, le foie est coloré en masse, prend une teinte jaune caractéristique ; sur une coupe, à la loupe, le pigment apparaît surtout accumulé dans les espaces portes.

Le pigment ferrugineux se trouve aussi en grande quantité dans la rate où il est accumulé dans de grandes cellules de la pulpe (2). On peut voir ces phénomènes dans les hémoglobinémies toxiques, ou à la suite des injections de sang hétérogène dans la cavité péritonéale. L'infiltration hépatique serait plus considérable chez les

(1) Les cellules de Kupffer peuvent être considérées comme des cellules endothéliales dégradées représentant l'endothélium des capillaires du lobule (voir ch. XI).

(2) Voir ch. XIV.

animaux auxquels on a enlevé la rate (1). La sidérose splénique a été vue parfois très intense dans les ictères hémolytiques, chez l'homme. On trouve aussi du pigment dans les ganglions, dans les grosses cellules libres des sinus et dans la moelle osseuse. Enfin, les organes excréteurs, et surtout le rein, contiennent aussi une grande quantité de pigment hématique.

En dehors des états hémolytiques bien définis, la sidérose a été trouvée chez l'homme dans un grand nombre d'autopsies et elle constitue le caractère le plus frappant du diabète bronzé ou *cirrhose pigmentaire*, syndrome dans lequel on trouve associées : une cirrhose hépatique avec sidérose, de la glycosurie et de la mélanodermie. Contrairement à ce qu'on pouvait attendre, l'étude du sang n'a pas toujours révélé les lésions de fragilité globulaire et d'hémoglobinémie permettant d'expliquer l'accumulation du pigment.

La nature du pigment ferrugineux n'est pas connue. Il s'agit certainement, non d'une substance chimique définie, mais d'un mélange où se trouve à la fois de l'hydrate ferrique et des composés organiques à différentes étapes de la dégradation.

Les relations chimiques qui unissent le pigment ferrugineux à l'hématine ne sont pas mieux connues. Le pigment ne représente pas une transition entre l'hématine et la bilirubine. On a supposé qu'il était, au même titre que la bilirubine, le produit de la désintégration de l'hématine ; mais les deux pigments ne se rencontrent pas simultanément au même point. On pense plutôt aujourd'hui que le pigment ferrugineux résulte de l'action des cellules et des tissus sur les globules épanchés et sur l'hémoglobine diffusée, la bilirubine se produisant d'une manière beaucoup plus indépendante de l'action des tissus. Dans les hématomes, on trouve les granulations ferrugineuses à la périphérie et la bilirubine au centre du caillot ; dans les petites hémorragies interstitielles où les cellules ont pu absorber tous les globules rouges, on ne trouve que du pigment ferrugineux et pas de bilirubine. *In vitro*, on a pu reproduire la bilirubine (2), mais pas le pigment ferrugineux.

Le *pigment ardoisé* de la pseudo-mélanose des cadavres donne aussi les réactions du fer. Cet état est caractérisé par la présence de taches ardoisées qu'on observe le long de l'intestin sur le péritoine.

(1) P. Chevallier, Thèse Paris, 1913. — Tedeschi, *J. de Physiol. et de Path. gén.*, 1899 ; — Asher, *Deutsche med. Woch.*, 1911. — Pugliese, *Archives italiennes de Biologie*, LVII, 1912 et *Centralblatt f. Physiologie*, XXV, 1912. Les animaux dératés perdent par les excréments plus de fer que les animaux normaux (voir ch. xiv).

(2) Ou plus exactement l'hématoporphyrine.

Ce pigment serait formé par un mélange de pigment ferrugineux et de sulfure de fer, le fer étant d'origine sanguine et l'hydrogène sulfuré provenant de la putréfaction.

Dans les pièces anatomiques immergées depuis longtemps dans une solution formolée, on voit apparaître un pigment foncé qui, au microscope, montre de fins cristaux foncés ayant un peu l'aspect des cristaux d'hémine. Ces cristaux se produiraient sous l'influence du formol, surtout dans les tissus d'hommes ou d'animaux morts d'intoxication. Il est bien probable que ces amas cristallins sont d'origine hémoglobique (1).

Relations du pigment ferrugineux avec les mélanines. — A côté des pigments qui donnent les réactions du fer et dont l'origine hématique est certaine, il faut placer les pigments noirs, les *mélanines* qui ne donnent pas les réactions du fer, mais qui sont en partie d'origine sanguine.

L'origine hémoglobique du pigment noir de la malaria est fort probable. Celle des mélanines véritables (peau, œil, etc.) est plus douteuse et en tout cas plus difficile à démontrer. Ces pigments existent dans l'épiderme, dans la rétine ciliaire, la choroïde, l'iris. On les trouve dans les cellules de la couche basale de l'épiderme et chez beaucoup de Vertébrés (Reptiles, Batraciens), dans l'intérieur de cellules conjonctives spéciales (chromatocytes) (2). Chez l'homme et les Mammifères on voit apparaître la mélanine en quantité dans les différentes mélanodermies et dans les tumeurs mélaniques (3).

Bien qu'on ait trouvé du fer dans quelques-unes de ces mélanines, les recherches chimiques n'ont pas réussi encore à montrer leur parenté avec l'hémoglobine. Leur ressemblance avec les substances qu'on obtient au cours de la destruction des protéiques par les acides et surtout dans l'oxydation de la tyrosine par la tyrosinase, a permis de supposer que les mélanines résultent de l'oxydation de substances protéiques par des oxydases (4). Les mélanines proviendraient ainsi

(1) Kobert, *loc. cit.*, p. 106 ;
Heile, *Virchow's Archiv*, CLX, 1900.

(2) On distingue des chromatocytes à pigment noir (mélanocytes) et des chromatocytes à pigment jaune (xanthocytes).

(3) Les tumeurs mélaniques de la peau, longtemps considérées comme des sarcomes, c'est-à-dire des tumeurs malignes conjonctives, sont en réalité le plus souvent des mélanocarcinomes, c'est-à-dire des tumeurs malignes d'origine épithéliale (Voir Darier, Ass. fr. pour l'étude du cancer, 21 novembre 1913, et *Précis de Dermatologie*, 1922).

(4) A l'action de ces oxydants peuvent s'ajouter celle du fer des noyaux, agissant comme catalyseur (Voir Lambling, *Biochimie*, 1921). La lumière, la chaleur, ont aussi une action. L'urine des malades porteurs de tumeurs mélaniques contient parfois un chromogène incolore que l'addition d'un oxyde fait noircir.

de la dégradation de substances albuminoïdes diverses et elles pourraient naître d'une manière absolument indépendante de l'hémoglobine.

Au point de vue histologique, quelques recherches récentes attribuent, dans certains cas, la formation de la mélanine à la transformation du pigment ferrugineux. Dans les cellules épidermiques, le pigment paraît fabriqué directement par la cellule. Mais chez les larves de Batraciens on voit, entre les cellules épidermiques, des cellules migratrices chargées de pigment ferrugineux; des granulations pigmentaires véritables apparaissent à côté des enclaves de pigment ferrugineux; ainsi se formeraient les chromatocytes étoilés intraépidermiques (1). Dans le foie, dans la queue des larves d'amphibiens, des chromatocytes noirs mésenchymateux se formeraient aussi de la même façon aux dépens de cellules migratrices chargées de pigment ferrugineux par phagocytose. Un certain nombre de cellules pigmentaires noires résulteraient donc de la transformation d'éléments migrateurs, de phagocytes chargés de globules rouges en destruction. Mais le pigment sanguin ne joue certainement pas là un rôle exclusif, et il est probable que diverses substances protéiques sont capables de former les grains de pigment (2).

Fig. 143. — Cristaux de Charcot vus de face et en coupe transversale au grand axe. 600 diam.

Cristaux du sang d'origine non hémoglobique. — Le sang et les tissus formateurs du sang peuvent donner lieu à la formation de cristaux qui n'ont aucun rapport avec l'hémoglobine et avec ses dérivés. Les plus intéressants de ces cristaux sont les cristaux de *Charcot* qui ont la forme de doubles pyramides à base octogonale réunies par leur base. Ils prennent naissance *in vitro* dans les préparations de sang leucémique; on les trouve dans la moelle osseuse des cadavres humains, dans l'expectoration bronchique de l'asthme et aussi *in vivo*,

(1) Prenant, *C. R. Assoc. Anatomistes*, Nancy, 1909 et *S. de Biologie*, 3 mai 1913. — Asvadourova, *S. de Biologie*, 1907 et *Archives d'An. micr.*, XV, 1913. En suivant l'évolution des foyers d'hémorragie cérébrale, Claude et Loyez (*S. de Biologie*, 27 mai 1911, et *Arch. de méd. exp.*, XXIV, 1912), ont vu apparaître une hémomélanine, inattaquable par les acides et les alcalis, ne donnant pas la réaction du fer et comparable à la mélanine de la malaria.

(2) D'après les idées exprimées par Prenant et par Asvadourova, au point de vue histologique, les grains de pigment apparaissent surtout à côté des enclaves cellulaires. Un grand nombre d'enclaves (corps graisseux, plaquettes vitellines, boules ferrugineuses, nucléoles devenus intracytoplasmiques), seraient capables d'être le support de cette formation. Enfin et surtout, les grains de mélanine auraient une origine mitochondriale : ils seraient, le plus souvent, des mitochondries transformées (chromochondries). Mulon a soutenu des idées analogues (*S. de Biologie*, 3 février 1912). Dans ces conditions, le rôle de l'hémoglobine dans la formation des mélanines deviendrait tout à fait accessoire.

dans certains foyers de nécrose du tissu lymphoïde. Il est très probable qu'ils proviennent des leucocytes; peut-être sont-ils formés de nucléo-protéides leucocytaires; ils sont assez voisins de certains cristaux trouvés dans le sperme. Nous y reviendrons (1).

On a aussi obtenu, à l'état cristallisé, l'albumine du sérum (2). Quant aux cristaux de fibrine, annoncés par quelques auteurs, ils seraient formés, d'après de récentes recherches, de stéarate de chaux (3).

L'hémoglobine chez les Invertébrés. — L'hémoglobine n'existe pas seulement dans le sang des Vertébrés. On trouve ce pigment respiratoire chez un grand nombre d'Invertébrés. Le plus souvent, l'hémoglobine est dissoute dans le plasma sanguin, comme on le voit chez de nombreux Annélides (*Lumbricus*) et chez des Insectes (larves de *Chironomus*), chez des Crustacés (*Cypris*, *Daphnia*, *Apus*, etc.), et chez des Mollusques (*Planorbis*). Enfin, l'hémoglobine peut colorer de véritables cellules ou hématies. Ces hématies peuvent se voir dans les vaisseaux sanguins (*Arca*, *Solen*). Plus souvent, elles sont contenues dans le liquide cœlomique, comme on l'observe chez différents Mollusques, chez des Échinodernes et surtout chez beaucoup d'Annélides polychètes (*Glycera*, *Capitella*, *Polycirrus*) et de Géphyriens (*Phascolosoma*, *Sipunculus*, *Thalassema*). Le mode de distribution de l'hémoglobine chez les Invertébrés est d'une grande irrégularité ; des espèces voisines présentent à ce sujet les différences les plus tranchées.

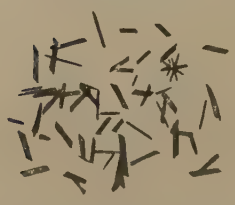


Fig. 144. — Cristaux d'hémine réguliers obtenus avec le sang du lombric. 325 diam.

La démonstration de la nature hémoglobique du pigment respiratoire rouge des Invertébrés se fait très facilement par l'analyse spectroscopique et par la recherche des cristaux d'hémine. Une goutte de sang rouge du lombric examinée entre lame et lamelle donne au spectroscope les bandes caractéristiques de l'hémoglobine. En desséchant la goutte sur une lame et en broyant avec un peu de chlorure de sodium la substance pulvérulente recueillie, on obtient par l'addition d'acide acétique et, en chauffant, de beaux cristaux d'hémine. On peut en obtenir aussi avec des larves de Chironomus, après les avoir desséchées et traitées comme précédemment.

Fig. 145. — Cristaux d'hémine obtenus avec du sang de planorbe. D'après Kobert.

Le pigment rouge qui colore les hématies contenues dans la cavité générale de certains Invertébrés, en particulier des Sipunculides, ne serait pas de l'hémoglobine, mais un pigment voisin dans lequel le fer, en proportion plus abondante, serait aussi uni plus lâchement aux protéiques. Ce pigment ferrugineux spécial,

(1) Voir ch. VI et XVII.

(2) Gruzewska, *C. R. Ac. des sc.*, 19 juin 1899 ; — Maillard, *Revue gén. des sciences*, 1898 ; — Chittenden et Hartwell, *J. of Physiology*, XI, 1890 ; — Wichmann, *Zeitschrift f. phys. Chemie.*, Bd. 27, 1899.

(3) Maillard, *Bull. de la Soc. chimique de Paris*, 1899 ; — Dzierzgowski, *Zeitschrift f. phys. Chemie*, XXVIII, 1899.

qui ne donnerait pas les cristaux de Teichmann, et sur la nature duquel on est encore mal renseigné, a été appelé *hémérythrine* (1).

Hémocyanine. — Nous avons déjà parlé des relations qui existent entre la constitution chimique des dérivés de l'hémoglobine et celle des dérivés de la chlorophylle, dans laquelle le magnésium tiendrait la place que tient le fer dans le pigment respiratoire des animaux. Chez différents invertébrés, on peut trouver dans le sang un autre pigment qui semble avoir un rôle respiratoire et dans lequel le cuivre tient la place du fer et donne au sang une teinte bleue très pâle. Ce pigment sanguin à base de cuivre ou *hémocyanine*, existe surtout chez des Mollusques (Céphalopodes et Gastéropodes) et des Crustacés (Décapodes); on l'aurait trouvé aussi chez des Échinodermes, des Holothuries, et des Tuniciers. Le sang de l'escargot (*Helix*) et du poulpe a été pris souvent comme objet d'étude pour l'étude de ce pigment. Il est, chez l'escargot, en trop petite quantité pour donner au sang une véritable couleur; mais la coloration bleue est très nette dans le sang du homard et de la langouste, surtout lorsqu'il a été exposé à l'air. Ce pigment se comporte vis-à-vis de l'oxygène et des réducteurs comme l'hémoglobine ; on le connaît à l'état d'oxyhémocyanine bleue et d'hémocyanine réduite, incolore (2). En soumettant à la dialyse du sang d'escargot, *Dhéré* et *Burdel* (3) ont obtenu de beaux cristaux bleus d'oxyhémocyanine ayant la forme d'octaèdres quadratiques tronqués biréfringents ou de bipyramides hexagonales.

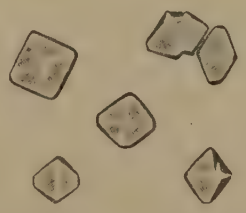


Fig. 146. — Cristaux d'oxyhémocyanine de l'escargot. Octaèdres quadratiques. D'après Dhéré et Burdel.

On a encore décrit, chez les Invertébrés, en particulier chez les Annélides et les Insectes, d'autres pigments respiratoires; mais ils sont encore très mal déterminés et leur rôle respiratoire n'est, du reste, pas absolument prouvé. Chez les Insectes, la coloration plus foncée que prend le sang à l'air chez beaucoup d'entre eux n'est pas modifiée par le vide; elle est stable presque toujours et peu reversible. Cependant le sang jaune de la chenille du bombyx qui a noirci à l'air peut être réduit par le sulfhydrate d'ammoniaque et reprend alors en partie sa teinte jaune primitive pour noircir de nouveau par exposition à l'air (*Cuénot*). Mais ces phénomènes successifs d'oxydation et de réduction n'ont probablement *in vivo* qu'un rôle très limité, car le sang du même animal conserve sa couleur jaune verdâtre, aussi bien chez les individus placés dans l'acide carbonique et dans l'oxygène que chez les témoins conservés à l'air libre. Ces pigments ne jouent donc pas ici un rôle comparable à celui de l'hémoglobine ou de l'hémocyanine. Le changement de couleur du sang est quelquefois en rapport avec la métamorphose, comme on le voit chez certaines chenilles, dont le sang noircit aux approches de la nymphose ; ici, la modification de cou-

(1) Metalnikoff, *Zeitschrift f. wiss. Zool.*, LXVIII, 1900 ; — Cuénot, *Travaux du laboratoire d'Arcachon*, 1900-1901. — Kobert, *Pflüger's Archiv*, XCVIII, 1903.

(2) P. Bert, *Leçons sur la Physiologie comparée de la respiration ;* — Fredericq, *C. R. de l'Ac. des sciences*, 16 décembre 1878 ; — Henze, *Zeitschrift f. phys. Chemie*, XLIII, 1904 ; — Phisalix, *S. de Biologie*, 28 juillet 1900 ; — Griffiths, *C. R. Ac. des sc.*, 29 février 1892 ; — Cuénot, *C. R. Ac. des sc.*, 11 juillet 1892. — Bottazzi, *J. de Phys.*, 1919.

(3) Dhéré, *C. R. Ac. des sc.*, 6 avril 1908 ; — Dhéré et Burdel, *S. de Biologie*, 4 avril 1914.

leur est le témoin des changements qui se produisent dans la nutrition de l'animal.

Le noircissement du sang des Insectes est probablement dû à l'action d'une diastase voisine de la tyrosinase sur un chromogène. Au cours de la digestion des éléments étrangers phagocytés, il se forme dans les leucocytes une mélanine sous l'influence des diastases oxydantes portées par ces cellules; secondairement, le pigment noir formé abandonne le leucocyte et se répand dans le sang; il est absorbé ensuite par les cellules péricardiales (1).

(1) Hollande, *S. de Biologie*, 15 mai 1920 et *Archives d'An. microsc.*, XVIII, 1922.

CHAPITRE V

GLOBULES BLANCS OU LEUCOCYTES. MORPHOLOGIE. PHYSIOLOGIE

Examinés dans une préparation de sang frais de l'homme ou d'un autre mammifère, les leucocytes apparaissent dans les espaces de plasma libre qui sont intermédiaires aux piles de globules rouges. Ils s'y trouvent en petit nombre, et en général isolés. Ils se reconnaissent à leur aspect incolore et brillant. Leur contour est arrondi ou irrégulier. Ils paraissent plus réfringents lorsqu'on relève la vis micrométrique et qu'on met au point en surface, indice de leur forme sphérique. Chez les Mammifères, ils sont un peu plus gros que les hématies ; chez les Vertébrés à globules rouges elliptiques et nucléés, ils sont en général plus petits que les hématies. Parfois le protoplasma contient des granulations brillantes, faciles à distinguer, et même volumineuses, chez certaines espèces. Le noyau ne se distingue pas ou se voit fort mal. Dans les cellules qui portent des granulations, on le reconnaît souvent sous forme d'un champ clair et homogène ; cet aspect est particulièrement net par l'éclairage intense sur fond noir. Le noyau n'est en effet visible, dans le leucocyte vivant, que d'une manière exceptionnelle. Chez certains Vertébrés cependant, chez les Batraciens urodèles (triton, salamandre, axolotl, etc.), le noyau des leucocytes est facilement visible pendant la vie de ces éléments.

Les leucocytes sont ainsi de véritables cellules, possédant un corps cytoplasmique nu et un noyau. Dans le sang frais d'une salamandre, le noyau paraît limité par une ligne brillante qui est la membrane nucléaire et on voit, à l'intérieur, des parties plus réfringentes qui correspondent à des grains de chromatine. Lorsque le noyau a une forme incurvée, on aperçoit, quelquefois dans le cytoplasme, dans la concavité du noyau, un champ arrondi, plus clair, qui correspond à la

« sphère ». Pour observer plus de détails, il faut s'adresser aux réactifs. En mélangeant la goutte de sang à une goutte d'une solution aqueuse d'acide acétique à 1 p. 100, on fait apparaître distinctement le noyau dans les leucocytes ; en ajoutant une trace d'une couleur nucléaire, fuchsine basique ou vert de méthyle, à la solution acétique, le noyau apparaît coloré. Une préparation de sang, fixée et colorée, montre plus nettement encore un noyau dans chaque leucocyte.

Les leucocytes n'existent pas seulement dans le sang ; on les trouve encore dans la lymphe du canal thoracique et dans la sérosité des cavités viscérales. La sérosité incolore ou lymphe de la cavité péritonéale ou de la cavité péricardique de la grenouille est un excellent objet pour les étudier. Dans une préparation fraîche de cette lymphe conservée pendant quelques jours, on voit apparaître, dans quelques leucocytes, le noyau, sous forme d'un petit globule réfringent, qui tend à se fragmenter. Ici, le noyau est apparu parce que la cellule est morte ; les phénomènes d'autolyse et d'imbibition ont modifié les rapports de réfringence entre le cytoplasme et le noyau, qui est ici très altéré.

Le phénomène le plus frappant que présentent les leucocytes examinés vivants dans le sang frais, ce sont les changements de forme spontanés dont ils sont le siège et que, par comparaison avec ceux des amibes, on a nommés mouvements amiboïdes. Ces changements de forme peuvent s'observer déjà à la température du laboratoire, même chez les Mammifères ; mais, comme nous le verrons en les étudiant de plus près, ils sont très influencés par l'élévation de la température.

MORPHOLOGIE DES LEUCOCYTES

Le noyau. — L'observation, même superficielle, d'une préparation de sang d'homme fixée et colorée permet de reconnaître immédiatement les leucocytes à leur noyau. La forme de ce noyau est très variable : dans les plus petits leucocytes, il est arrondi et vivement coloré ; dans d'autres cellules, plus volumineuses, il est plus gros, ovalaire ou réniforme et il est peu coloré. Il est limité par une membrane colorable, et dans l'intérieur on aperçoit des grains de chromatine supportés et reliés par une charpente spongieuse plus ou moins bien marquée. Mais la plupart des noyaux ont un aspect découpé et contourné : les uns ont la forme d'un fer à cheval plus ou moins incurvé ou celle d'un boudin replié sur lui-même et étranglé en différents points ; ces

étranglements arrivent à séparer le noyau en plusieurs masses reliées par des filaments très minces. Ces noyaux polymorphes peuvent prendre des formes très compliquées. Lorsque le boyau nucléaire est divisé en quelques segments, ces segments sont toujours réunis par des filaments ; mais au premier abord, on pourrait les croire séparés, d'où le nom de *polynucléaires* souvent donné à ces leucocytes. Dans le sang de certains animaux, chez le rat et la souris, par exemple, on rencontre communément des leucocytes dont le noyau a une forme annulaire; ce noyau peut être tordu en 8.

On s'est demandé quelquefois si les mouvements protoplasmiques des leucocytes n'étaient pas la cause de ces formes nucléaires bizarres. Lorsqu'on observe les mouvements amiboïdes d'un leucocyte, chez un animal où le noyau est bien visible à l'état vivant, dans la lymphe de l'axolotl par exemple, on constate, de la manière la plus nette, que la forme du noyau est fortement modifiée par le mouvement de la cellule ; le noyau s'allonge, s'étire avec elle, il s'avance même sous forme de petits bourgeons dans les pseudopodes ; il revient sur lui-même et redevient globuleux dans les mouvements de contraction ; en un mot, il subit passivement l'action du protoplasma fluide et contractile qui l'entoure de toutes parts. Mais ces changements de forme causés par le mouvement amiboïde paraissent momentanés ; le mouvement protoplasmique ne suffit pas à expliquer la forme compliquée du noyau bourgeonnant, annulaire, ou segmenté, qui est le résultat du développement propre du noyau dans la cellule. Du reste, les leucocytes ne sont pas les seuls éléments qui présentent un noyau découpé, segmenté ou bourgeonnant, et on connaît un certain nombre d'exemples de noyaux bourgeonnants appartenant à des cellules ne possédant pas de mouvements amiboïdes, comme ceux qui ont été décrits dans les cellules sericigènes d'un grand nombre d'insectes (1).

Quand on observe les mouvements des leucocytes de l'axolotl, et qu'on suit un globule qui s'étale régulièrement sur la lame comme une goutte d'huile, on peut quelquefois observer, par suite du grand étalement, la perforation du noyau; cependant, la formation des noyaux annulaires se produit dans le tissu lymphoïde (chez l'axolotl, le rat, la souris, etc.) d'une autre façon : par la dépression progres-

(1) Dans l'épithélium qui revet la membrane basale postérieure de la cornée (membrane de Descemet), on peut observer, avec l'âge de l'animal, des transformations remarquables du noyau qui, arrondi chez les jeunes animaux, se transforme progressivement en un noyau réniforme. Cette transformation paraît être en relation avec le développement de la sphère attractive, toujours située dans la dépression du noyau (Ballowitz, *Archiv f. mikr. Anatomie*, LVI, 1900).

sive d'un noyau ovalaire ou arrondi (1). Le noyau annulaire, par la production d'étranglements, donnera lieu à un anneau moniliforme qui, par exagération des étranglements et par section, donnera un noyau polymorphe du type le plus habituel. Peut-être les échanges de liquides qui se passent entre le noyau et le cytoplasme ont-ils une part dans la production de ces phénomènes.

La complication plus ou moins grande du noyau polymorphe est jusqu'à un certain point l'indice de l'état d'évolution du leucocyte : le nombre des segments nucléaires est d'autant plus grand que la cellule est plus âgée. Mais cette observation n'autorise pas toutes les déductions qui en ont été faites dans l'étude de la leucocytose. Le nombre des lobes n'a rien d'absolu.

Dans les noyaux arrondis des plus petits leucocytes, la chromatine est disposée en gros grains, les uns situés dans le champ nucléaire, les autres accolés à l'intérieur de la membrane ; ils sont assez rapprochés, de sorte que ces noyaux paraissent en général vivement colorés. Dans les gros noyaux ovalaires ou réniformes, la chromatine est rare et disposée en grains très fins ; la charpente nucléaire est délicate et ne se voit que sur des préparations très bien fixées ; elle disparaît sur les préparations desséchées où ces noyaux paraissent colorés d'une façon diffuse. Dans les noyaux polymorphes, la chromatine est disposée en petites masses ordinairement allongées suivant l'axe du cordon nucléaire, et qui s'appuient en partie contre la face interne de la membrane.

Dans tous ces noyaux, la chromatine prend électivement les couleurs nucléaires et basiques ; les grains plus gros et vivement colorés ne sont que des portions de chromatine plus volumineuses, situées aux points nodaux d'une charpente plus fine et incolore ; ce ne sont pas des nucléoles. Les nucléoles vrais ou *plasmatiques* (par opposition aux précédents qu'on appelle quelquefois nucléoles chromatiques) sont des portions différenciées de chromatine qui prennent les couleurs acides ou se colorent par les couleurs basiques avec métachromasie. Ces nucléoles n'existent pas dans les cellules sanguines, dans les conditions normales ; on les trouve au contraire très souvent dans les cellules lymphoïdes indifférentes des tissus hématopoiétiques.

(1) Des noyaux annulaires ont été observés aussi dans des cellules épithéliales. *Henneguy, Kostanecki, Meves* ont montré que, dans certains cas, ils dérivent de noyaux en mitose dont la membrane se constitue prématurément à l'intérieur de la couronne formée par les anses chromatiques (Voir Henneguy, *Leçons sur la cellule*, Paris, 1896, p. 398).

Cytoplasme. — Lorsqu'on examine, à un grossissement suffisant, les leucocytes vivants du sang frais, le cytoplasme paraît homogène ou très finement granuleux ; dans certains leucocytes, il porte des granulations réfringentes. Dans le sang de l'homme, beaucoup de leucocytes portent de très fines granulations, peu réfringentes ; comme le montrent les observations comparatives, ces leucocytes sont ceux qui possèdent un noyau polymorphe. D'autres, beaucoup moins nombreux, portent des granulations plus grosses et plus réfringentes colorables par les couleurs acides ; le noyau de ces cellules est en général bilobé. Ce sont les leucocytes éosinophiles. Chez la plupart des vertébrés, un certain nombre de leucocytes sont ainsi porteurs de granulations distinctes, contenues dans un cytoplasme homogène et dont les affinités diverses pour les substances colorantes ont été le point de départ d'une classification de ces éléments en variétés cellulaires. En outre, le protoplasma des leucocytes contient des grains et filaments très fins qui ne peuvent se voir qu'avec des méthodes appropriées et qui appartiennent au protoplasma de la plupart des cellules : ce sont les mitochondries.

Granulations des leucocytes. Variétés de globules blancs. — Les globules blancs du sang ne sont pas tous semblables et l'analyse morphologique et physiologique permet de distinguer entre eux des variétés cellulaires. Entrevue par *Warthon Jones* (1846), par *Virchow* (1853) et par *Robin* (1856), cette distinction a été établie de la manière la plus nette par *Max Schultze* (1865) qui, dans le sang frais de l'homme, avait exactement reconnu les différents types cellullaires que nous distinguons aujourd'hui (1).

Plus tard, *Ehrlich* (1878-79), appliquant les couleurs d'aniline à l'étude méthodique des leucocytes granuleux, vit que les granulations n'avaient pas, dans tous les leucocytes, les mêmes réactions colorantes. Pensant qu'il y avait là des types cellulaires bien distincts par leurs caractères et leurs fonctions, il chercha à les distinguer par ces réactions qui lui parurent constantes pour chaque type et, par conséquent, spécifiques ; on pouvait, dès lors, retrouver avec certitude ces types cellullaires dans les organes hématopoiétiques et attribuer à tel ou tel organe, suivant les cas, les variations leucocytaires observées dans le sang (2).

(1) Max Schultze, *Archiv f. mikr. Anatomie*, I, 1865.

(2) P. Ehrlich, *Farbenanalytische Untersuchungen zur Histologie und Klinik des Blutes* Berlin, 1891 ; — Ehrlich und Lazarus, *Die Anæmie*, I. Abth. *Normale und path. Histologie des Blutes, in specielle Pathologie und Therapie de Nothnagel*, VII, Vienne, 1898 ; — J. Jolly,

Variétés de leucocytes du sang de l'homme et des mammifères. — Dans une préparation de sang d'homme, fixée et colorée, on peut distinguer les variétés suivantes :

Lymphocytes. — Ce sont des cellules de petite taille, dont les plus petites ont un diamètre voisin de celui des globules rouges. Le noyau est régulièrement arrondi, parfois incisé et en forme de bissac replié fortement sur lui-même. La chromatine apparaît formée de gros grains serrés disposés d'une manière assez régulière contre la membrane et dans l'intérieur du noyau; le réseau nucléaire est riche en chromatine et se colore vivement. Il n'y a pas de nucléoles vrais. Dans les plus petites de ces cellules, le protoplasma ne forme qu'une très mince collerette autour du noyau (*petits lymphocytes*). D'autres ont une taille plus grande, le noyau est plus gros, et surtout le cytoplasme est plus abondant; il paraît, à l'état vivant, homogène ou très finement granuleux, mais on n'y voit pas de granulations distinctes comme dans d'autres leucocytes. Ce cytoplasme se colore assez bien par les couleurs basiques. On peut y mettre en évidence, par des méthodes appropriées, des mitochondries. Les méthodes dans lesquelles interviennent les éosinates d'azur, sur des préparations fixées, y colorent des grains peu nombreux, très distincts des granulations particulières aux leucocytes. Ce sont les grains *azurophiles* (1).

Fig. 147. — Sang d'homme fixé frais par un mélange chromo-osmique. Hématéine, éosine. Lymphocyte. 1.300 diam.

Ces granulations azurophiles ne sont pas reconnaissables dans le sang frais et vivant, ni à l'éclairage ordinaire, ni à l'éclairage sur fond noir. Elles n'ont pas d'affinité pour les bleus de méthylène. L'azur de méthylène employé seul ne les colore pas non plus. Elles ne sont visibles que sur des préparations colorées par les colorants qui contiennent les éosinates d'azur de méthylène. Elles apparaissent de couleur pourpre, peu nombreuses, très irrégulièrement distribuées souvent contenues dans des vacuoles; elles existent aussi dans le protoplasma des mononucléaires. Elles ne semblent pas particulières à

Archives de méd. exp., juillet et septembre 1898 et article Sang *in* Cornil et Ranvier, *Manuel d'Histologie pathologique*, 3e édition, t. II, p. 478; — Fr. Weidenreich, *Die Leucocyten und verwandte Zellformen*, Wiesbaden, 1911; — Levaditi, *le Leucocyte et ses granulations*. Scientia, 1902; — Kanthack and Hardy, *J. of Physiology*, XVII, 1894-1895; — L. Gulland, *J. of Physiology*, 1896. — Pappenheim, *Leucocytes*, *in* Gilbert et Weinberg, I, Paris, 1913, et *Folia hæmatologica*, XXIV, 1919; — Pappenheim et Ferrata, *Über die verschiedenen lymphoiden Zellformen des normalen und pathologisches Blutes*, Leipsig, 1911; — Ferrata, *Le Emopatie*, Milano, 1918.

(1) Michaelis et Wolff, *Virchow's Archiv*, CLXVII, 1902..

un type de leucocytes et ont même été vues dans d'autres cellules (1). Elles paraissent donc n'avoir aucun rapport avec les granulations protoplasmiques propres à certaines variétés de leucocytes. Elles se rapprochent, par contre, des grains de sécrétion qui ont été trouvés dans un grand nombre de cellules d'origine mésenchymateuse.

Mononucléaires (2). — Ce sont des cellules plus grandes, dont le noyau, volumineux, rarement arrondi, plus souvent ovalaire ou réniforme, est pauvre en chromatine. Sur les préparations de sang desséché, le noyau se colore d'une façon homogène et pâle. Sur les préparations bien fixées sans dessiccation, par les mélanges chromo-osmiques ou les vapeurs osmiques, on distingue nettement un réseau chromatique, mais à travées minces, peu nombreuses, à points nodaux petits et sans nucléole vrai. Certains ont un noyau en bissac profondément découpé ; ce sont ceux qui ont été décrits sous le nom de formes intermédiaires. Le cytoplasme est clair, abondant, quelquefois d'aspect membraniforme sur les préparations étalées. Il est homogène et, avec les méthodes usuelles, en dehors des grains azurophiles, ne montre pas de granulations (3). Il se colore très faiblement par les couleurs basiques.

Fig. 148. — Sang d'homme. Leucocyte mononucléaire portant des grains azurophiles.

Polynucléaires (4). — Le noyau de ces leucocytes est unique ; mais il est polymorphe, découpé, contourné sur lui-même et formé de différents lobes réunis par des filaments. Quelquefois les lobes semblent partir d'un point central ; plus souvent ils forment une série linéaire et représentent un noyau cylindrique qui aurait été étiré ou étranglé par places. La forme annulaire n'est pas rare chez certains animaux. Chez l'homme, elle est très exceptionnelle ; le noyau polymorphe est

(1) Aubertin et Chabanier, *Ann. de médecine*, II, 1915. — Betancès, Th. Paris, 1918. — Hertz, *Folia hæmatologica*, XV, 1913.

(2) *Syn. :* Grands mononucléaires, monocytes.

(3) Dans certaines de ces cellules, on peut trouver des granulations « neutrophiles » analogues à celles des leucocytes polynucléaires. Ces cellules sont des formes immatures, appartenant aux tissus hémopoiétiques ou au sang pathologique. Chez l'homme et chez la plupart des mammifères, les mononucléaires granuleux (myélocytes) n'appartiennent pas au sang normal ou s'y trouvent en très petit nombre. Par contre, les méthodes de coloration dans lesquelles intervient l'azur de méthylène, colorent en rouge, dans les mononucléaires, quelques granulations « azurophiles ». Ces granulations, par la teinte qu'elles prennent, par leur petit nombre, donnent à la cellule un aspect très différent de celui des myélocytes granuleux. Toutefois, pour éviter des confusions, il faudra s'adresser à des méthodes de coloration différentes, dont on comparera les résultats. La détermination des myélocytes granuleux dans le sang, dans les cas où ils sont en petit nombre, ne pourra être certaine que par l'emploi de méthodes de coloration dans lesquelles n'intervient pas l'azur. Dans ce cas, on utilisera avec profit le triacide

(4) *Syn. :* Leucocytes à noyau polymorphe.

presque toujours formé d'un cordon replié en fer à cheval, ou en S, quelquefois formant une boucle ou une spire. Ce cordon est divisé en 3, 4 ou 5 segments réunis par des filaments extrêmement minces. La chromatine est divisée en petites masses anguleuses, allongées dans le sens du cordon nucléaire et prenant point d'appui sur la membrane. Il n'existe pas de nucléoles vrais.

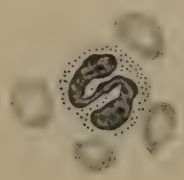


Fig. 149. — Sang d'homme. Vapeurs osmiques, Giemsa. Leucocyte polynucléaire. 930 diam.

Quelques auteurs ont attribué une signification à la complication plus ou moins grande du noyau polymorphe et ont classé, dans le sang de l'homme, les leucocytes en catégories suivant le nombre des segments nucléaires; mais ces distinctions n'ont probablement pas l'importance qu'on leur a quelquefois accordée. Sur les préparations desséchées ou mal fixées, les segments paraissent quelquefois complètement séparés ; mais sur les préparations bien fixées sans dessiccation, on distingue presque toujours un filament unissant. La séparation complète des lobes n'appartient guère qu'à la dégénérescence et à la mort du noyau.

Le microcentre se trouve toujours au centre de l'anneau ou du fer à cheval formé par le noyau polymorphe. Il est très difficile à voir chez l'homme et les Mammifères, mais facile à mettre en évidence avec les méthodes appropriées chez les Batraciens.

Tandis qu'il existe, entre les différents lymphocytes et mononucléaires, dans le même sang, des différences de diamètre très sensibles, les leucocytes à noyau polymorphe ont, au contraire, un diamètre très uniforme.

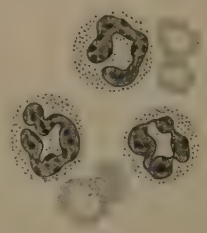


Fig. 150. — Sang d'homme. Vapeurs osmiques; éosine, orange, toluidine. Leucocytes polynucléaires. 930 diam.

Les fines granulations que l'on voit dans le cytoplasme de ces leucocytes, déjà dans le sang frais, peuvent être colorées par beaucoup de méthodes. *Ehrlich* a montré qu'elles avaient une affinité spécifique pour les couleurs neutres, d'où le nom de *neutrophiles* donné souvent chez l'homme à ces granulations, et aussi aux leucocytes qui les portent (1). En réalité, ces granulations sont

(1) Cette granulation correspond à la granulation ε, dans la classification d'Ehrlich. Le cytoplasme de ces leucocytes contient parfois, à côté des granulations neutrophiles, quelques grains basophiles colorés en rouge par le mélange de Pappenheim (vert de méthyle-pyronine). Ces inclusions ont été rencontrées surtout au cours de certaines maladies fébriles (scarlatine, tuberculose). Elles ont été d'abord considérées comme des

colorables par les couleurs acides, mais cette affinité est peu énergique (1); elle est masquée par l'emploi de l'hématoxyline comme colorant nucléaire, mais elle se voit bien avec les doubles colorations éosine-bleu. Elles sont colorées en violet par le mélange triacide et en rouge par les méthodes où interviennent les éosinates d'azur. Insolubles dans l'eau, ces granulations sont gonflées et rendues plus visibles si la préparation desséchée est trempée dans l'eau et colorée sans faire intervenir de fixateur.

Fig. 151. — Sang d'homme fixé frais. Eosine, orange, toluidine. Leucocyte éosinophile. 1.300 diam.

Leucocytes éosinophiles. — Dans le sang frais de l'homme, ces leucocytes, bien que peu nombreux, sont très faciles à reconnaître à cause des granulations volumineuses et réfringentes que porte leur cytoplasme. Sur les préparations fixées et colorées, leur noyau apparaît lobulé, mais son aspect est assez particulier : il est presque toujours constitué par deux masses rondes ou ovalaires, de volume à peu près semblable et le plus souvent réunies par un mince filament (2). Parfois le noyau est seulement étranglé, en bissac; plus rarement il est formé de trois lobes. Ces caractères du noyau sont assez fixes pour qu'on puisse reconnaître ces cellules au seul aspect de leur noyau; toutefois, ce qui les distingue encore plus, ce sont les granulations que porte leur cytoplasme (3). Ces granulations sont plus volumineuses et plus réfringentes que celles des leucocytes à noyau polymorphe. Comme elles, elles sont insolubles dans l'eau qui les gonfle un peu et augmente leur affinité pour les couleurs acides. Ces granulations sont caractérisées par leur affinité pour les couleurs acides (4) et en particulier pour l'éosine, d'où le nom donné aux cellules qui les portent. Avec les bleus de méthylène, la thionine, la toluidine, employés seuls, elles prennent une coloration verte. Les autres couleurs basiques ne les colorent pas ou les colorent en une teinte très pâle. Sans l'action de mordants,

Fig. 152. — Sang d'homme. Vapeurs osmiques. Giemsa. Leucocyte éosinophile. 930 diam.

Parasites (corps de Dœhle); il s'agit plutôt de grains de sécrétion (Cf. P. Weill, *Archives d'An. micr.*, XVIII, 1921).

(1) Jolly, *S. de Biologie*, 18 février 1899.

(2) Jolly, *Soc. de Biologie*, 21 mai 1898 et *Archives de méd. exp.*, 1898.

(3) Elles correspondent à la granulation α dans la classification d'Ehrlich.

(4) Elles sont insolubles dans l'alcool absolu, l'éther, le chloroforme, l'essence de térébenthine et ne sont pas colorées par l'acide osmique ; l'iode les teinte seulement en jaune.

les couleurs basiques ne les colorent pas électivement; il est cependant possible, avec l'emploi des mordants, de les colorer par des couleurs nucléaires.

L'acide acétique étendu d'eau ne les dissout pas, mais il les modifie et gêne leur coloration; lorsqu'on veut rechercher ces cellules dans les tissus, il vaut mieux employer des fixateurs ne contenant pas d'acide acétique ou en contenant très peu. Les solutions alcalines très étendues ne produisent pas le même effet; elles les gonflent souvent un peu, comme l'eau, mais ne gênent pas leur colorabilité.

La forme de ces granulations est ordinairement arrondie. Chez l'homme et la plupart des mammifères, elles sont rondes, de volume assez uniforme et régulier; leur diamètre est en général un peu inférieur à 1 μ; il est assez fixe pour une même espèce. Chez le cheval, les granulations sont très volumineuses; elles atteignent 3 et 4 μ de diamètre, elles peuvent prendre une forme ovoïde et diffèrent beaucoup de l'une à l'autre. Nous verrons un peu plus loin que chez certaines espèces, des granulations ayant les mêmes réactions prennent la forme de grains de blé et de cristalloïdes.

Fig. 153. — Sang d'homme. Vapeurs osmiques, Giemsa. Mastzelle. 930 diam.

Leucocytes à granulations basophiles, mastzelles. — A côté des quatre types de cellules que nous venons de décrire, on peut trouver encore, mais en nombre extrêmement faible, dans le sang de l'homme, d'autres leucocytes caractérisés surtout par la présence, dans leur cytoplasme, de granulations qui se colorent électivement par les couleurs d'aniline basiques et prennent, avec les bleus de méthylène et les violets de méthyle, une teinte rougeâtre métachromatique. Ce sont les leucocytes à granulations basophiles. Leurs réactions sont les mêmes que celles des cellules granuleuses décrites par *Ehrlich* dans le tissu conjonctif sous le nom de « mastzellen (1) ». Mais certaines recherches tendent à montrer que, malgré des réactions communes, elles ne sont pas toujours identiques (2).

Bien que les granulations soient visibles dans la cellule vivante, ces leucocytes sont assez difficiles à reconnaître dans le sang frais de

(1) *Syn.* : Leucocytes à granulations γ d'Ehrlich, labrocytes, mastocytes.

(2) Aussi distingue-t-on parfois les mastzelles sanguines (leucocytes à granulations basophiles, mastleucocytes), des mastzelles du tissu conjonctif (cellules d'Ehrlich, labrocytes, mastocytes).

l'homme, à cause de leur petit nombre. Ils sont à peu près de même taille que les leucocytes éosinophiles. Sur les préparations de sang bien fixées, et colorées, par exemple, par une solution de toluidine, le noyau apparaît bleu et les granulations colorées en violet ou en rouge. Le noyau est polymorphe, mais sa forme est distincte de celle du noyau des leucocytes polynucléaires (1). Elle est plus compacte et les lobes volumineux partent d'un centre commun.

La charpente nucléaire est assez serrée ; on n'y voit pas de nucléole. Les granulations sont moins régulières de forme et de volume que les granulations éosinophiles ; elles sont aussi moins réfringentes. Elles se colorent par le rouge neutre dans le sang frais. En dehors de leur affinité spéciale pour les bleus basiques et de la couleur rouge qu'elles prennent avec la thionine et la toluidine, ces granulations ont un autre caractère important : elles sont très altérables par l'eau après les fixations insuffisantes; elles sont altérées aussi par les acides et les alcalis à certaines doses; aussi sont-elles bien fixées seulement par les réactifs ne contenant pas d'acide acétique (2).

Formes inusitées des leucocytes du sang. Myélocytes et myéloblastes. — Les différentes variétés de leucocytes que nous venons d'étudier représentent, dans le sang de l'homme, des types cellulaires évolués bien délimités entre lesquels les formes de passage n'existent pas ou sont exceptionnelles; car c'est dans les tissus et non dans le sang que s'accomplissent ces différenciations. Au cours de certains états pathologiques, on voit apparaître des formes inusitées, parfois en grand nombre comme dans les leucémies, et qui peuvent aussi s'observer parfois dans le sang normal, mais en nombre infime. Ces éléments sont des cellules immatures, incomplètement évoluées, représentant les cellules mères des leucocytes que nous retrouverons dans les tissus hématopoiétiques, et particulièrement dans la moelle osseuse, et qui, dans certains cas, arrivent prématurément dans le sang.

La plupart de ces éléments correspondent aux *myélocytes*. Ce sont des leucocytes de taille en général assez grande, à noyau volumineux, ovalaire ou réniforme, à réseau chromatique délicat, contenant souvent un ou plusieurs nucléoles. Le protoplasma porte des granulations : les unes sont fines et possèdent les réactions des granulations des polynucléaires habituels ; les autres ont les réactions des

(1) Weidenreich, *Archiv f. mikr. Anatomie*, LXXII, 1908.

(2) Voir sur les réactions histochimiques de ces cellules : Jolly, *Ass. des an.* Lyon, 1901. Levaditi, Thèse Paris, 1902 et Maximoff, *Archiv f. mikr. Anatomie*, LXXXIII, 1913. Cf. aussi ch. vi.

granulations éosinophiles. Aussi a-t-on distingué des *myélocytes neutrophiles* (à fines granulations oxyphiles) et des *myélocytes éosinophiles*. Ces formes cellulaires apparaissent en grand nombre dans le sang de la leucémie myélogène (voir chap. XVII) où elles peuvent montrer des figures de mitose et de dégénérescence.

Fig. 154. — Sang de leucémie myéloïde. Myéloblaste en train de se transformer en myélocyte éosinophile. 1.000 diam.

A côté de ces *myélocytes granuleux*, il faut distinguer des *myélocytes non granuleux* ou *myéloblastes* (1) de taille assez variable, à noyau arrondi ou ovalaire, possédant presque toujours un ou deux nucléoles et dont le protoplasma, homogène, se colore assez vivement par les colorants basiques. Ces formes cellulaires représentent les cellules originelles des leucocytes. Elles apparaissent en grand nombre dans certaines formes de leucémie, où elles peuvent présenter des mitoses. Nous les étudierons plus en détail à propos de l'hématopoièse et des leucémies (2).

Dans certaines formes de leucémie, on peut voir apparaître, en grand nombre, des cellules ayant l'aspect de myéloblastes de petite taille, à noyau nucléolé volumineux ressemblant à celui des myélocytes, à cytoplasme très faiblement basophile. Ces *petits myéloblastes* ou *leucoblastes* existent dans la moelle et dans les ganglions. Dans le sang, ils ne se voient qu'à l'état pathologique (3).

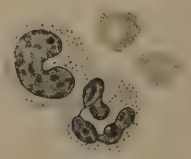


Fig. 155. — Sang d'homme (leucémie myéloïde). Vapeurs osmiques ; éosine, orange, toluidine, myélocyte neutrophile à noyau incurvé (métamyélocyte) et polynucléaire. 900 diam.

Il est très rare de rencontrer dans le sang normal, des leucocytes dégénérés. Ces formes cellulaires peuvent apparaître, mais en général en petit nombre, au cours de certaines intoxications et dans les leucémies. Elles sont le plus souvent caractérisées par

(1) *Syn.* : Myélocytes basophiles, promyélocytes.

(2) Voir surtout ch. XI, XII, XVII. Dans le sang, il est impossible de distinguer les myéloblastes des cellules analogues provenant des ganglions ou de la rate. Les cellules de *Türk* ou forme « d'irritation » ne sont qu'un aspect anormal des myéloblastes ; elles ressemblent souvent à des cellules plasmatiques de grande taille ; leur protoplasma est très basophile ; elles peuvent apparaître dans les leucocytoses et se colorent parfois par l'hématoxyline. Les cellules de *Rieder* sont des leucoblastes à noyau fortement échancré ou découpé en grosses masses et rappelant un noyau polymorphe.

(3) Voir ch. XII, XIII et XVII. Les myéloblastes et leucoblastes peuvent contenir, accessoirement, des granulations azurophiles. Ces granulations sont distinctes des granulations neutrophiles, colorables en violet par le triacide, qui prennent naissance dans les myéloblastes et les transforment en myélocytes (Voir Hertz, *Folia hæmatologica*, XV, 1913). Elles ne représentent pas un stade immature de la granulation neutrophile.

la pycnose du noyau, qui se colore en masse ou se fragmente (voyez plus loin). Parfois le protoplasma contient de grosses vacuoles incolores (1).

On peut trouver dans le sang des leucocytes chargés de granulations graisseuses, colorables en coloration vitale par le soudan et noircissant dans les solutions d'acide osmique. Ces granulations sont surtout portées par les polynucléaires. On les retrouve plus facilement dans le pus. Dans le sang, au cours des leucocytoses, on peut mettre en évidence dans l'intérieur des leucocytes des gouttelettes de glycogène. On peut les voir en exposant la goutte de sang étalée et encore humide aux vapeurs dégagées de cristaux d'iode et en montant la préparation dans une solution sirupeuse de lévulose ou de saccharose. On peut aussi recouvrir la partie desséchée par une goutte d'une solution iodo-iodurée, recouvrir d'une lamelle et examiner avec un objectif à immersion. On peut aussi employer la gomme iodée (2).

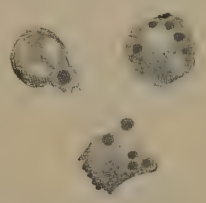


Fig. 156. — Pus blennorrhagique. Leucocytes contenant des gouttelettes de glycogène colorés par l'iode. 750 diam.

Les leucocytes qu'on trouve dans le sang circulant peuvent, dans certains cas, contenir des parasites. Exceptionnellement, on peut y trouver des globules rouges phacocytés. Ces faits, qu'on n'observe en général que dans les organes hématopoiétiques, ont été vus dans le sang de certaines anémies et chez des malades atteints d'hémoglobinurie (3). Les globules rouges et leurs débris se trouvent dans les grands mononucléaires.

Morphologie comparée. — On retrouve dans le sang de la plupart des mammifères les mêmes types cellulaires que chez l'homme, avec quelques différences cependant.

Chez le lapin, les leucocytes à noyau polymorphe contiennent de fines granulations qui, par leur grosseur et par leurs réactions sont intermédiaires à celles des polynucléaires et des éosinophiles de l'homme (4). Elles sont très faciles à mettre

(1) Cet aspect vacuolé du protoplasma est fréquent dans les leucoblastes de la leucémie aiguë, mais il est alors le plus souvent le résultat d'une altération artificielle due à une fixation insuffisante, comme le montre l'examen comparatif de préparations de sang desséché et fixé à l'état humide.

(2) Ehrlich et Lazarus, *Die anœmie;* Salmon, Th. Paris, 1899; Gabritschewsky, *Archiv f. exp. Path.* XXVIII, 1891; Lœper, *Archives de med. exp.*, XIV, 1902. Pour la recherche du glycogène dans les coupes on pourra employer aussi la méthode de Best au carmin ammoniacal (Cf. Best, *Ziegler's Beiträge*, XXXIII, 1903 et Schridde et Naegeli, *Die hämatologische Technik*, 2e éd. Iéna, 1921).

(3) P. Weill, Réunion biologique de Strasbourg, 17 décembre 1920. *C. R. de la S. de biologie*, LXXXIII, p. 1644.

(4) Elles correspondent à la granulation β dans la classification d'Ehrlich.

en évidence, après la plupart des fixations ; on peut les voir en employant, après la fixation par les vapeurs d'acide osmique, l'hématéine comme colorant nucléaire, alors que, dans ces conditions, l'éosine ne colore jamais les granulations des polynucléaires de l'homme. Comme les granulations acidophiles dont nous avons déjà parlé, elles sont insolubles dans l'eau, gonflées par l'eau, altérées par les solutions acétiques. Elles sont visibles sur la cellule vivante. Leur affinité très nette pour les couleurs acides les a fait quelquefois confondre avec les véritables cellules éosinophiles qui existent aussi dans le sang du lapin ; aussi les a-t-on nommées quelquefois pseudo-éosinophiles. Ce sont des granulations oxyphiles à affinité moindre que les véritables granulations éosinophiles. Dans certaines conditions de fixation, ces granulations peuvent être colorées par les couleurs basiques. Avec le bleu de Unna employé seul sur les préparations fixées par dessiccation suivie de l'alcool absolu ou de l'acide chromique, elles se colorent en violet rouge (1). Cette réaction pourrait les faire confondre avec les granulations des mastzelles qui existent aussi dans le sang du lapin, mais dont la granulation est plus grosse, soluble dans l'eau et jamais colorable par les couleurs acides.

Fig. 157. — Sang de cobaye. Vapeurs osmiques. Giemsa. Lymphocyte contenant un corps de Kurloff. 1.125 diam.

Chez le cobaye, les polynucléaires contiennent, comme chez le lapin, des granulations dont l'affinité pour l'éosine est assez énergique (2) ; dans les conditions habituelles, ces granulations prennent les couleurs acides et non les couleurs basiques, bien qu'on les ait quelquefois considérées comme prenant indistinctement les couleurs acides ou basiques (d'où le nom d'amphophiles qui leur a été quelquefois donné). Les leucocytes du sang de cobaye présentent encore quelques particularités : dans le protoplasma de certains mononucléaires, on peut observer, inclus dans une vacuole, un gros globule beaucoup plus volumineux que les granulations leucocytaires, atteignant 3 ou 4 μ de diamètre ; il se colore en rose par l'éosine, et donne l'impression d'une gouttelette huileuse. Ces corps, qui semblent avoir été vus pour la première fois par *Kurloff*, n'existent guère que dans le sang du cobaye ; ils sont colorables dans le sang frais, par les colorations dites vitales. Vraisemblablement il s'agit d'un produit de sécrétion ; on peut apercevoir parfois, à côté de la grosse gouttelette, des gouttelettes plus petites, capables de se réunir en une seule.

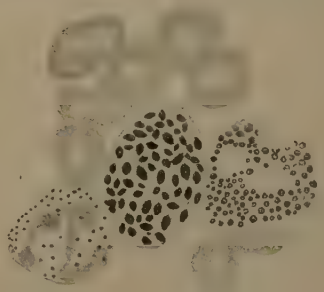


Fig. 158. — Sang de cobaye ; vapeurs osmiques, Giemsa. Groupe d'éléments montrant les trois variétés de leucocytes granuleux au centre, mastzelle ; à droite, leucocyte à granulations éosinophiles ; à gauche, leucocyte polynucléaire à fines granulations acidophiles. 1.300 diam.

Les leucocytes à granulations basophiles présentent chez le cobaye un aspect

(1) Cette réaction ne s'observe pas après la fixation du sang par les vapeurs osmiques (Dominici).

(2) Correspondant aussi à la granulation β d'Ehrlich.

tout spécial et ils sont faciles à reconnaître : ce sont des leucocytes assez grands, à noyau polymorphe, dont les granulations, volumineuses, sont ovoïdes ou allongées en forme de grains de blé ; leurs réactions sont celles des mastzelles en général, mais avec quelques petites différences : leur métachromasie est faible et elles prennent un peu l'hématéine (1).

Chez la plupart des autres mammifères, le protoplasma des leucocytes à noyau polymorphe apparaît très finement granuleux, mais ne contient pas, en général, de granulations colorables électivement ; on a pu cependant en colorer, chez le singe, le chien, le chat, le cheval, la vache et le porc (2) ; chez tous ces animaux, les leucocytes à noyau polymorphe sont toujours faciles à reconnaître à leur noyau, dont la lobulation est quelquefois plus accentuée ou un peu différente de celle des leucocytes de l'homme (3).

Dans le sang du rat et de la souris, le noyau polymorphe a souvent une forme annulaire ; le cordon nucléaire qui forme l'anneau est très souvent étranglé, segmenté, divisé en lobes réunis par des filaments ; le noyau annulaire peut se présenter tordu sur lui-même, en 8, probablement à la suite des mouvements amiboïdes de la cellule. Chez la souris, les petits lymphocytes sont en général volumineux, leur noyau est plus gros que chez l'homme.

Fig. 159. — Rat. Epiploon. Leucocyte éosinophile ; le centrosome est visible au centre du champ limité par le noyau annulaire. 1.500 diam.

Les leucocytes éosinophiles, chez la plupart des espèces de mammifères examinés, répondent au type décrit chez l'homme : le noyau est bilobé. Chez le rat, il a la forme d'un anneau qui peut être irrégulièrement étranglé en divers points. Les granulations, comme aspect, forme, volume, réfringence et réactions colorantes, se rapprochent beaucoup de celles de l'homme ; chez la souris et chez le rat, elles sont plus fines que chez l'homme ; chez d'autres, comme chez le mouton, elles sont plus grosses. Chez le cheval, elles sont énormes, souvent de forme ovoïde, et atteignant 3 μ de diamètre ; elles sont naturellement peu nombreuses dans chaque cellule ; elles sont aussi, dans la même cellule, de diamètre un peu inégal (4).

Chez quelques mammifères, les granulations éosinophiles peuvent prendre la forme de courts bâtonnets ; cet aspect a été signalé parfois chez le lapin, le chien, le cobaye, le porc. Cette forme cristalloïde des granulations acidophiles est beaucoup plus fréquente chez les Oiseaux et les Reptiles.

(1) J. Jolly, *Archives d'anatomie micr.*, III, 1900 ; — Maximoff (*Archiv f. mikr. Anatomie*, LXVII, 1906) aurait observé dans le sang du hérisson, des leucocytes analogues.

(2) Hirschfeld, *Virchow's Archiv*, CXLIX, 1897 ; — Weidenreich, *Die Leucocyten*, l. c., 1911 ; — J. Jolly, *S. de biologie*, 10 novembre 1906 ; — Gütig, *Archiv f. mikr. Anatomie*, LXX, 1907 ; — Mezinscescu, *Archives de méd. exp.*, XIV, 1902 ; — Sabrazès, Muratet et Durroux, Réunion biologique de Bordeaux, 7 juillet 1908 ; — Jolly et Vallée, *S. de biologie*, 3 novembre 1906 ; — Du Toit, *Folia hæmatologica*, XXI, 1916 ; — Furno, *Folia hæmatologica*, XI, 1911 ; — Pappenheim *in* Gilbert et Weinberg et *Folia hæmatologica*, 1919. — Cf. aussi Schwarz, *Ergebnisse der allgemeine Path.*, XVI, 1914.

(3) La granulation des polynucléaires du singe a les mêmes réactions que la granulation ε de l'homme. Chez le chien, le chat, le rat, la souris, elle serait aussi, d'après Pappenheim (*Folia hæmatologica*, XXIV, 1919), une véritable granulation neutrophile.

(4) Jolly, *Archives d'an. micr.*, III, 1900. Les réactions colorantes des granulations éosinophiles sont, chez certains mammifères, un peu différentes de ce qu'elles sont dans le sang de l'homme.

Chez beaucoup de mammifères, on trouve dans le sang, en petit nombre, des leucocytes à granulations basophiles; elles rappellent en général celles de l'homme, mais le volume, la forme et même les réactions des grains peuvent varier (1).

Quand on étudie le sang des autres vertébrés, on constate que les leucocytes répondent à des types assez variés ; il ne faut donc pas se presser de les homologuer à ceux des Mammifères. D'une manière générale, on trouve dans le sang des Oiseaux, des Reptiles, des Batraciens et des Poissons, des leucocytes à noyau arrondi et à protoplasma homogène répondant au type lymphocyte, et aussi des leucocytes à noyau polymorphe contenant souvent des granulations acidophiles. Chez les Oiseaux, on trouve dans le sang des cellules rappelant les petits lymphocytes de l'homme et des Mammifères ; puis des mononucléaires à protoplasma homogène, prenant un peu les couleurs basiques et se teignant en violet pâle par l'hématéine, à noyau arrondi, ovalaire ou incurvé, enfin des leucocytes à granulations éosinophiles ; le noyau de ces derniers se présente le plus souvent sous la forme incurvée, en bissac ou bilobée, que nous avons observée chez la plupart des mammifères. Quant aux granulations, elles se colorent vivement par les couleurs acides, elles sont assez volumineuses et se présentent, soit sous forme arrondie, soit sous une forme allongée, cristalloïde. Ces leucocytes granuleux acidophiles paraissent représenter, chez les Oiseaux, l'ensemble des leucocytes à noyau polymorphe granuleux de l'homme et des mammifères (polynucléaires et leucocytes éosinophiles); les réactions histo-chimiques de ces granulations sont un peu différentes de celles des granulations acidophiles des Mammifères.

Fig. 160. — Sang de canard fixé à l'état frais. Leucocyte éosinophile à grains cristalloïdes. 1.500 diam.

Les granulations arrondies semblent répondre à un stade jeune de la granulation acidophile, et les grains cristalloïdes à un stade évolué. Dans les tissus hématopoiétiques de l'embryon et du jeune animal, les cellules à grains acidophiles arrondis sont extrêmement nombreuses (2).

Chez les Reptiles, malgré des différences suivant les espèces, les types cellulaires du sang ressemblent beaucoup à ceux qu'on observe chez les Oiseaux; c'est du moins ce qui résulte de mes observations, faites surtout chez les Lacertiens. C'est une raison de plus de rapprocher les uns des autres les Oiseaux et les Reptiles que d'après leurs caractères morphologiques ont été depuis longtemps réunis aux Oiseaux sous la dénomination de Sauropsidés. On trouve, en effet, dans le sang de ces animaux, des cellules ayant les caractères des lymphocytes, des mononucléaires à large protoplasma, très faiblement basophile et une seule variété de leucocyte à granulations acidophiles. Le noyau polymorphe répond ordinairement à la forme en bissac ; les granulations sont ordinairement volumineuses, arron-

(1) Nous avons vu plus haut les réactions spéciales de ces cellules chez le cobaye. Chez certains mammifères (chat, rat, souris, etc.), ces leucocytes à granulations basophiles sont inexistants ou rarissimes. Chez le lapin, on peut trouver, à l'état normal, des cellules ayant l'aspect de lymphocytes de grande taille, à protoplasma abondant, vivement coloré par les couleurs basiques et même par l'hématoxyline et l'hématéine. Ces leucocytes répondent aux « cellules de Türk ».

(2) Jolly, *S. de Biologie*, 25 février 1911, et *Archives d'anatomie micr.*, XVI, 1915. — Launoy et M. Lévy-Bruhl, *Annales Pasteur*, 1914 ; — Grünberg, *Virchow's Archiv*, CLXIII, 1901. — Cullen, *Johns Hopskins Bull.*, XIV, 1903 ; — Dantschakoff, *Archiv f. mikr. Anatomie*, LXXIII, 1909 ; — Kasarinoff, *Folia hæmatologica*, X, 1910.

dies, très franchement acidophiles ; elles ont souvent la forme cristalloïde (1). Ces leucocytes, ordinairement nombreux, représentent la cellule migratrice typique ; comme chez les Oiseaux, elle correspond à la fois aux polynucléaires et aux éosinophiles des Mammifères. Il existe aussi, dans le sang de beaucoup de reptiles, des leucocytes à granulations basophiles (mastzelles). Chez les lézards de nos pays (*L. agidis*, *L. viridis*), ces cellules sont ordinairement petites, à noyau compact, arrondi, ou peu découpé ; les grains sont arrondis, de grosseurs différentes dans la même cellule, souvent peu nombreux ; ils prennent électivement les couleurs basiques avec ou sans métachromasie, et se colorent même par l'hématoxyline ou l'hématéine.

Dans le sang des Batraciens, on retrouve facilement les mêmes types cellulaires que chez les Mammifères, surtout chez les Urodèles. Dans le sang du triton, on trouve à côté de petits et de gros lymphocytes, des leucocytes à noyau polymorphe dont l'aspect est à peu près semblable à ceux de l'homme, mais dont le cytoplasme, très finement granuleux ou homogène, très faiblement teinté par les couleurs basiques, ne contient aucune granulation électivement colorable. On observe aussi des éosinophiles, à grains arrondis et à noyau en bissac ; et enfin des leucocytes à granulations basophiles. Ces derniers sont des cellules petites ; les grains ont des réactions caractéristiques et se colorent vivement en rouge par les bleus basiques ; le noyau est massif, peu découpé, ordinairement échancré ou bilobé. On trouve les mêmes formes cellulaires dans le sang des autres urodèles et chez les Anoures (*Rana*, *Bufo*) dans le sang desquels les leucocytes à noyau polymorphe, moins nombreux que chez les urodèles, et moins nombreux que les lymphocytes, ne portent pas non plus de granulations (2). Les formes de passage entre les lymphocytes et les leucocytes à noyau polymorphe se voient facilement dans le sang des Batraciens.

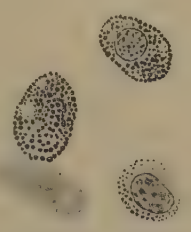


Fig. 161. — Lézart vert. Sang du cœur ; mastzelles. 800 diam.

Chez les Poissons, il est assez difficile de donner une description d'ensemble, parce que la composition du sang est très variable suivant les espèces. Ce qui résulte cependant des observations, c'est que les cellules analogues aux lymphocytes sont constantes et dominent. Les cellules à granulations acidophiles, bien représentées dans certains groupes, paraissent manquer dans beaucoup d'espèces ; leur homologation à celles des autres vertébrés est difficile. En raison du volume plus considérable de ses éléments sanguins, c'est le sang des Sélaciens qui a été le plus étudié (3) (*Scyllium*, *Raja*, *Torpedo*, etc). On y trouve des lymphocytes, et des

(1) Comme chez les Oiseaux, la granulation cristalloïde paraît un stade évolué de la granulation acidophile arrondie. Voir Kollmann, *S. de Biologie*, 1er juillet et 29 juillet 1911, et 20 avril 1912. Elle diffère dans sa forme et dans ses réactions. Voir aussi pour le sang des Reptiles : Jordan et Flippin, *Folia hæmatologica*, XV, 1913, et Dantschakoff, *Archiv f. mikr. An.*, LXXXVII, 1916.

(2) Jolly, *Archives d'anatomie micr.*, VI, avril 1904 ; — Grünberg, *Virchow's Archiv*, CLXIII, 1901 ; — Maximoff, *Ziegler's Beiträge*, XXXIX, 1906 ; — Sabrazès et Muratet, *Folia hæmatologica*, VI, 1908 ; — Neumann, *Virchow's Archiv*, CLXXIV, 1903 ; — Dekhuyzen, *Verh. der anat. Gesellschaft Wien*, 1892 ; — Freidsohn, *Archiv f. mikr. Anatomie*, LXXV, 1910 ; — Werzberg, *Folia hæmatologica*, XI, 1911.

(3) Drzewina, *Archives de Zoologie exp.*, III, 1905 ; *Archives d'An. micr.*, XII, 1910 et XIII, 1911 ; *S. de Biologie*, 27 janvier 1906 et 13 juin 1908.

leucocytes à granulations éosinophiles, volumineuses, à réactions nettes, et ordinairement arrondies. Chez certaines espèces, on peut trouver, à côté de leucocytes éosinophiles à grains arrondis, des cellules à grains cristalloïdes. Les lymphocytes et les cellules granuleuses acidophiles sont les seuls éléments bien caractérisés. On a décrit aussi des leucocytes à noyau polymorphe sans granulations et des cellules du type lymphocyte contenant des granulations acidophiles ; les cellules à granulations basophiles paraissent manquer.

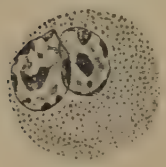


Fig. 162. — Sang de triton. Leucocyte à granulations éosinophiles. 830 diam.

Chez les Téléostéens, ce qui domine, chez toutes les espèces, ce sont les lymphocytes. Des leucocytes à granulations acidophiles ont été trouvés dans le sang d'un certain nombre d'espèces, mais ils paraissent manquer chez beaucoup d'autres (1). Chez les Ganoïdes, les lymphocytes dominent encore ; mais il existe aussi, d'après les observations de *Drzewina* (2), des leucocytes granuleux dont l'homologation à ceux des autres vertébrés n'est pas possible. Chez les Dipneustes, *Bryce* (3) a observé dans le sang d'embryons de *Lepidosiren*, des lymphocytes, de gros mononucléaires hyalins, des leucocytes à noyau polymorphe et à granulations acidophiles, et aussi des cellules à grains éosinophiles distinctes des précédentes, à noyau en fer à cheval, lobé ou annulaire. D'après les recherches de *Drzewina* (4) et de *Stephan* (5) sur le tissu lymphoïde du Protoptère, il existerait, chez cet animal, des leucocytes à grosses granulations éosinophiles qui, par leur aspect et leurs caractères, seraient très distinctes de celles des autres vertébrés.

Fig. 163. — Sang de triton. Mastzelle. 830 diam.

Chez les Cyclostomes (*Pétromyzon*) on trouve dans le sang, des lymphocytes, des leucocytes à noyau polymorphe et à fines granulations neutrophiles ou faiblement oxyphiles et des cellules à granulations éosinophiles (6).

Valeur morphologique et signification des différentes variétés de leucocytes du sang. — L'observation du sang de tous les Vertébrés permet de distinguer, parmi les leucocytes, des variétés cellulaires. Ces distinctions sont légitimes, car si on prend, par exemple, le sang de l'homme, ces différents types cellulaires s'y trouvent en proportion fixe et leurs variations ne se produisent que dans des conditions bien déterminées (7). Mais ces distinctions n'ont

(1) Siawcillo, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1895 ; — Drzewina, *S. de Biologie*, 27 mars 1909 ; — Rawitz, *Archiv f. mikr. Anatomie*, LIV, 1899, et LVI, 1900 ; — Meinertz, *Virchow's Archiv*, CLXVIII, 1902 ; — Lanine, Thèse Lausanne, 1912 et *Archives de Biologie*, XXVII, 1912.

(2) Drzewina, *S. de Biologie*, 11 juin 1904.

(3) Bryce, *Trans. R. Soc. of Edinburgh*, XLI, 1904.

(4) Drzewina, *loc. cit.*, 1905.

(5) Stephan, *Réunion biologique de Marseille*, 20 novembre 1906.

(6) Renaut, *Archives de physiologie*, 1881 ; — Giglio-Tos, *R. Accad. sc. Torino*, 1896, et *Arch. ital. de biologie*, XXVII, 1897 ; — Pappenheim, *Folia hæmatologica*, XXIV, 1919.

(7) Voir ch. vii.

de valeur absolue que pour une même espèce; d'autre part, le type cellulaire doit être déterminé à la fois par l'ensemble de ses caractères microscopiques (forme du noyau, aspect du cytoplasme, réactions des granulations, etc.), et non par un seul de ces caractères.

Si du sang de l'homme on passe à celui des autres mammifères, on retrouve les mêmes types cellulaires, mais un peu modifiés. L'homologation de ces types devient plus difficile chez les Oiseaux, les Reptiles, les Batraciens et surtout chez les Poissons.

Dans le sang de l'homme et des Mammifères, les formes de passage sont assez rares ; elles n'existent guère qu'à l'état pathologique. Chez les Batraciens urodèles, chez lesquels une partie de l'hématopoièse se fait dans le sang même, les formes intermédiaires sont moins exceptionnelles. Chez les Vertébrés supérieurs, les variétés de leucocytes, dans le sang, apparaissent bien distinctes et c'est dans les tissus hémopoiétiques qu'il faut aller chercher leurs relations histogénétiques.

Lorsqu'on commença à faire ces distinctions, deux positions très différentes furent adoptées : pour les uns, toutes ces variétés n'étaient que des aspects de cellules semblables, différant seulement par leur âge ou des états fonctionnels passagers ; pour d'autres, au contraire, il y avait là des différences complètes, aussi tranchées qu'entre une cellule musculaire lisse et une cellule musculaire striée. Nous savons aujourd'hui que ces types cellulaires sont avant tout le résultat d'une différenciation, analogue à celle qui se voit dans les épithéliums ou dans le tissu conjonctif (1) ; mais comme l'évolution des cellules sanguines, chez les Vertébrés supérieurs, se passe presque exclusivement dans les tissus hématopoiétiques, nous ne pouvons nous rendre compte, par l'examen du sang, des liens de parenté qui unissent ces cellules, et seule l'étude de l'hématopoièse peut nous les faire connaître. Dans le sang de l'homme et de la plupart des mammifères, les polynucléaires, les éosinophiles et même les grands mononucléaires peuvent être considérés comme des stades ultimes de différenciation, comme des éléments ayant atteint leur maturité, les lymphocytes étant seuls capables d'évolution ultérieure, mais en dehors du sang. Le plus grand nombre des leucocytes du sang, au moins chez les Vertébrés supérieurs, sont donc des formes évoluées, définitives, à peu près incapables de changements (2).

Chez l'homme et les Vertébrés supérieurs, les lymphocytes pro-

(1) Jolly, *S. de Biologie*, 22 novembre 1902.

(2) Pour les relations histogénétiques des différents leucocytes, voyez les chapitres consacrés à l'hématopoièse et, en particulier, ch. XII.

viennent surtout des centres germinatifs des ganglions et du tissu lymphoïde du tube digestif et de la rate ; les polynucléaires et les éosinophiles se forment dans la moelle où ils proviennent de la différenciation des myéloblastes et des myélocytes. Les grands mononucléaires ont une origine plus discutée. Beaucoup d'entre eux semblent provenir des ganglions lymphatiques, des cellules de revêtement des sinus lymphatiques (1). Bien qu'en fait, les lymphocytes et les granulocytes proviennent de sources différentes, les ganglions, la rate, la moelle osseuse, ne forment pas des catégories de tissus absolument tranchées. Déjà à l'état normal, surtout chez certaines espèces, des lymphocytes peuvent se former dans la moelle et des granulocytes dans la rate ; la distinction s'efface encore plus à l'état pathologique (2).

Nature des granulations des leucocytes. — La nature de ces granulations n'est pas connue (3). L'opinion suivant laquelle les granulations éosinophiles correspondraient à des microbes absorbés, transformés par l'activité cellulaire, n'a pas été conservée. L'origine hématique des granulations éosinophiles est

(1) Peut-être un certain nombre d'entre eux représentent-ils des cellules conjonctives modifiées, des cellules endothéliales vasculaires et péritonéales mobilisées.

(2) Partant de ses recherches sur l'application des couleurs d'aniline à l'étude du tissu conjonctif, *Ehrlich*, à partir de 1879, avait cherché dans les réactions colorantes, un moyen de caractériser les granulations des leucocytes. Il distingua ainsi, suivant leur affinité, un certain nombre de granulations, qu'il désigna par des lettres de l'alphabet grec. Il s'agissait là pour lui, de substances spécifiques, caractérisant une variété de leucocytes, comme la graisse caractérise la cellule adipeuse, comme les grains de pigment caractérisent la cellule pigmentaire. L'idée d'*Ehrlich* était la suivante : si on arrive à déterminer d'une manière suffisante les cellules sanguines par les réactions colorantes de leur cytoplasme, on pourra les retrouver dans les tissus et on pourra ensuite, en présence de telle réaction sanguine, préciser l'origine des cellules arrivées au sang. Cette idée a conduit *Ehrlich* à nous faire connaître avec précision les formes mères des leucocytes granuleux dans la moelle osseuse; mais cette manière de voir, systématisée à l'excès, et faisant des lymphocytes d'une part, des leucocytes granuleux d'autre part, deux variétés cellulaires absolument indépendantes par leur nature et par leur origine, a conduit à une conception schématique qui ne s'est plus trouvée d'accord avec les faits. Les discussions qui ont eu lieu à ce sujet n'ont plus guère d'intérêt aujourd'hui. Ce qu'il faut faire remarquer seulement, c'est que nos moyens d'investigation par les matières colorantes sont encore si limités, qu'il est difficile de fonder sur eux aujourd'hui des déterminations absolument précises. L'affinité pour les couleurs acides n'est pas particulières aux granulations leucocytaires. D'autre part, des cellules sanguines qui, dans les expériences, nous apparaissent comme jouant le même rôle (par exemple, polynucléaires des Mammifères, des Oiseaux, des Batraciens) montrent un cytoplasme tout à fait différent. Les réactions colorantes des granulations sont donc, à elles seules, insuffisantes pour permettre une classification des leucocytes ; la forme du noyau, par exemple, est un caractère tout aussi important ; ces déterminations doivent être faites à l'aide de tous les caractères de la cellule et en évitant les homologations d'espèce à espèce, et surtout entre espèces éloignées.

(3) En dehors des granulations qui sont propres à certains d'entre eux, les leucocytes peuvent contenir des corps phagocytés (hématies, grains de pigment, boules de myéline, etc.); ils peuvent contenir du glycogène, de la graisse et des substances lipoïdes (voir plus loin). On y a observé aussi des inclusions encore indéterminées (Rehder, *Deutsches Archiv f. klin. Medicin.*, CXXIV, 1918. P. Weill, *Archives d'An. micr.*, XVIII, 1921).

encore soutenue aujourd'hui par divers auteurs. Ces granulations seraient le résultat de l'absorption de globules rouges dégénérés, phagocytés à l'état de fragments granuleux ou transformés en granules dans l'intérieur du leucocyte (1). Mais cette opinion n'est pas prouvée ; elle s'appuie seulement sur les faits suivants : *a*) les grains, vus dans le sang frais, dans le leucocyte vivant, ont une très légère teinte jaune, particulièrement facile à voir dans les leucocytes du sang et de la moelle osseuse du cheval, dont les grains sont très volumineux ; *b*) ces grains ont une affinité pour les couleurs acides, comme les hématies ; *c*) on peut observer une coïncidence entre la destruction d'hématies et la formation de cellules éosinophiles. Au voisinage des foyers hémorragiques et dans les organes hémopoiétiques, on peut observer la destruction des globules rouges en grains acidophiles incorporés ensuite par des lymphocytes dont le noyau se transforme secondairement. *Weidenreich* et *Schott* ont observé ainsi, dans l'épiploon du lapin, la formation de nombreuses cellules éosinophiles après l'injection de sang de cobaye dans la cavité péritonéale.

A côté de ces arguments favorables, on peut faire valoir quelques objections : l'affinité des granulations et des hématies pour les couleurs acides est un rapprochement insuffisant ; beaucoup d'autres substances que l'hémoglobine prennent l'éosine. Du reste, les réactions colorantes des globules rouges et des granulations éosinophiles sont un peu différentes (2). Quelques auteurs auraient trouvé du fer dans les granulations éosinophiles. Si le fait était définitivement confirmé, il aurait une certaine importance. Mais les grains éosinophiles, dans les cellules intactes, ne donnent pas les réactions du fer ; d'autre part, ces grains sont fort difficiles à isoler (3).

L'apparition de cellules éosinophiles dans le tissu conjonctif, au voisinage des foyers de destruction des globules rouges, est un fait qu'on peut constater chez les Mammifères et chez les Batraciens. Mais toutes les éosinophilies locales ne sont pas liées à la présence de globules rouges en destruction. Il est difficile aussi de penser que tous les éosinophiles de la moelle osseuse serait formés de cette façon. Il faudrait admettre l'origine hématique d'autres granulations, comme celles des polynucléaires du lapin et du cobaye dont les réactions acidophiles sont fort nettes. Il est probable que la phagocytose de granulations hématiques est capable de donner naissance à des leucocytes d'aspect granuleux, distincts des éosinophiles.

(1) Weidenreich, *Leukocyten*. Voir aussi Asvadourova, *Archives d'an. micr.*, XV, 1913 et Schwarz, *Ergebnisse der allgemeine Path.*, XVI, 1914.

(2) Avec les mélanges éosine-orange, fuchsine acide-orange, les globules rouges sont colorés en orangé, tandis que les granulations prennent la teinte rouge de la fuchsine ou de l'éosine. Lorsqu'on trempe dans l'eau une lame de sang desséchée depuis peu, les globules rouges sont tous détruits tandis que les granulations ne sont pas dissoutes.

(3) Petry (*Biochemische Zeitschrift*, XXXVIII, 1912) serait arrivé à isoler les granulations éosinophiles de la moelle osseuse du cheval en profitant de la résistance de ces granulations à la digestion par la trypsine. Mais, malgré les précautions prises par l'auteur pour éloigner l'hémoglobine, il est bien difficile ici d'être certain que le fer n'est pas d'origine hématique ; il y a, en effet, dans la moelle, à côté de l'hémoglobine des globules rouges, des pigments sanguins à différents états de dégradation. Enfin, il ne faut pas oublier que les granulations leucocytaires sont capables de se teindre par l'hémoglobine diffusée dans le plasma environnant (J. Jolly, *S. de Biologie*, 18 février 1899). L'existence de granulations éosinophiles dans les leucocytes d'invertébrés ne possédant pas d'hémoglobine est encore un argument contre leur nature hémoglobique.

L'hypothèse qui a été le plus souvent émise sur la nature des granulations des leucocytes est celle qui les considère comme des grains de sécrétion et qui a été émise pour la première fois par *Ranvier* en 1875 (1). Les cellules lymphatiques étaient pour lui à ce point de vue, « des glandes unicellulaires mobiles ». Ce fut à cette interprétation que se rattacha *Ehrlich* lorsque, partant de ses recherches sur le tissu conjonctif, il chercha dans les réactions colorantes une méthode précise pour caractériser les différentes granulations des leucocytes ; et c'est cette manière de voir qui a rencontré le plus de faveur.

La solubilité très grande des granulations basophiles des matzelles-leucocytes et des cellules analogues du tissu conjonctif (2) montre qu'il s'agit là d'une substance très distincte du cytoplasme, et probablement sécrétée par lui (3). Cette substance n'a pu être isolée et on n'en connaît pas la composition ; l'analogie des réactions colorantes y a fait voir quelquefois une substance voisine de la mucine. *Weidenreich* admet que les grains proviennent du noyau dont l'extrémité bourgeonnante des lobes serait capable de se transformer en grains par une sorte de phénomène de dégénérescence (4). Des faits du même genre ont été mis en avant pour certaines cellules pigmentaires.

Les granulations colorées dans les leucocytes du sang frais au moyen du rouge neutre et les granulations azurophiles semblent bien être l'expression d'une sécrétion interne. Leur inconstance, leur nombre variable sont en faveur de cette opinion. La constance des diverses granulations acidophiles, leur fixité apparente, semblent au contraire opposées à l'idée d'une sécrétion interne. Malgré quelques observations isolées (5), il est certain que chez les Vertébrés supérieurs, le nombre et l'aspect des granulations paraît fixe et non modifié par les changements d'état fonctionnel. Toutefois, dans les tissus hémopoiétiques, on assiste à l'élaboration de ces grains dans un protoplasma homogène. Quant à une sécrétion externe, au passage de ces granules dans le plasma, rien jusqu'ici ne permet de l'ad-

(1) Ranvier, *Traité technique d'Histologie*, 1re édition, 1875, p. 175 ; 2e édition. p. 147.

(2) Cellules d'Ehrlich, mastzelles, mastocytes.

(3) Dans la moelle osseuse de beaucoup d'animaux, les granulations acidophiles, au moment de leur apparition, sont amphophiles ou même basophiles. Leur coloration, à ce stade, par le vert de méthyle, chez les Oiseaux, les a fait considérer par *Kollmann* comme des nucléo-protéides ; en devenant acidophiles, elles donneraient la réaction de Millon et deviendraient des albumines pures (*S. de Biologie*, 20 avril 1912). La manière dont se comportent les granulations acidophiles vis-à-vis des solvants n'est pas la même suivant les espèces. Celle des Oiseaux et des Reptiles paraissent beaucoup plus solubles que celles des Mammifères (Kollmann, *S. de Biologie*, 9 mars 1912). Il y a donc là des substances différentes.

(4) Weidenreich, *Archiv f. mikr. An.*, LXXII, 1908. — Meirowsky, *Folia hæmatologica*, VI, 1908. — Downey, *Folia hæmatologica*, XVI, 1913. — La solubilité de la substance basophile des mastzelles dans l'eau explique l'apparition d'un halo autour de la cellule dans les préparations de tissu conjonctif mal fixées et colorées ensuite avec des solutions colorantes aqueuses. Cet artefact a été interprété à tort comme la preuve d'une sécrétion externe (voir ch. VI). La participation du noyau à la formation des grains des mastzelles est possible ; il est, par contre, assez peu probable qu'il s'agisse d'une dégénérescence.

(5) Drzewina (*S. de Biologie*, 27 janvier 1906), en faisant vivre dans l'eau de mer additionnée progressivement d'eau douce, des téléostéens marins, a obtenu la disparition plus ou moins complète des leucocytes acidophiles du sang ; les granulations diminuent de volume, deviennent plus confluentes, se colorent plus faiblement et finissent par disparaître. Voir aussi Ehrlich, *la Leucocytose*, XIIIe Congrès int. de médecine, Paris, 1900, Kollmann, Thèse sciences, Paris, 1908, et Fiessinger, *J. méd. français*, 1920.

mettre (1). La résistance de ces granulations à un grand nombre de dissolvants (alcool, éther, essences, etc.) montre qu'il ne s'agit pas là de graisses ni de lipoïdes. Leur altérabilité par les acides, leur ressemblance avec les granulations vitellines, avec les grains d'aleurone, colorables également par l'éosine, leur aspect souvent cristalloïde sont en faveur de l'hypothèse qui voit en eux des albuminoïdes de réserve. Les mitochondries sont rares ou absentes dans les leucocytes éosinophiles bien caractérisés ; on a pensé alors que ces granulations seraient le résultat de la transformation des mitochondries, comme beaucoup de grains de sécrétion ; mais la question, pour les leucocytes, n'est pas résolue.

La diversité d'aspect et de réaction de ces granulations, d'une espèce à l'autre, permet de supposer qu'il s'agit de substances complexes, très intimement unies au protoplasma. Cette diversité d'aspect ou de réaction est particulièrement frappante pour les leucocytes polynucléaires. Chez le lapin et le cobaye, leurs granulations sont relativement grosses et nettement colorables par les couleurs acides ; chez l'homme, elles sont plus fines et leur affinité pour les couleurs acides est beaucoup plus faible ; chez beaucoup d'autres mammifères, elles sont excessivement fines et sans colorabilité élective, ou même elles n'existent pas et ne sont plus représentées que par un protoplasma vaguement granuleux. Il est bien difficile alors de les considérer comme des grains de sécrétion ; il faudrait plutôt voir en elles le protoplasma lui-même ; elles représenteraient seulement un état physique particulier du protoplasma vivant. Nous nous représentons aujourd'hui le protoplasma comme formé par l'association de substances à l'état colloïdal, c'est-à-dire à l'état d'émulsions ultra-fines. Lorsque ces granules colloïdaux sont en contact, ils constituent un gel apparaissant homogène à l'examen ultra-microscopique. Mais les édifices physiques formés par les granules colloïdaux sont extrêmement variés ; on peut supposer ces granules plus ou moins distincts les uns des autres et plus ou moins gros. Les granulations des leucocytes polynucléaires pourraient être considérées comme des granules colloïdaux de grosseur plus grande, formant des édifices physiques compliqués, mais constituant encore le protoplasma dont la portion transparente et homogène (hyaloplasma) serait à l'état de gel (solution colloïdale solide). Le gonflement des grains par l'eau, si facile à voir, les expériences citées plus haut montrant la disparition de certains grains par la dessalure sont des faits qui peuvent être donnés en faveur de cette hypothèse ; les recherches à venir montreront dans quelle mesure elle est justifiée. Certains faits, que nous examinerons un peu plus loin, ont permis de supposer que les granulations des polynucléaires sont le support de ferments leucocytaires.

En résumé, les granulations diverses des leucocytes ne paraissent pas toutes susceptibles de la même interprétation : les unes peuvent être rapprochées des grains de sécrétion (granulations des mastzelles, granulations azurophiles, granulations colorables par le rouge neutre, corps de Kurloff, etc.) ; d'autres sont comparables aux albuminoïdes de réserve, aux grains vitellins, aux plastes de la cellule végétale (certaines granulations éosinophiles) ; elles sont peut-être pour une part le résultat de la transformation de mitochondries et formées par des complexes lipo-protéiques ; certaines (granulations des polynucléaires) paraissent

(1) Si nous connaissons mal les variations du nombre des granules en rapport avec les modifications physiologiques, c'est peut-être que ces observations sont beaucoup plus difficiles à réaliser avec les leucocytes qu'avec les glandes salivaires ou le pancréas par exemple. Voir plus loin les observations de *Zotta* sur la granulation azurophile des Insectes, et celle de *Hollande* sur les cellules sphéruleuses.

répondre surtout à un aspect physique du protoplasma; elles en son' partie constituante et ne peuvent disparaître que par dégénérescence.

Mitochondries des leucocytes. — *Benda* (1) a décrit en 1897, sous le nom de *mitochondries* (2) des grains souvent alignés en forme de chaînettes ou de filaments. Ce sont les mêmes éléments décrits en 1890 par *Altmann* (3) sous le nom de *bioblastes*. Ils sont de très petite taille et apparaissent soit sous forme de grains alignés en série, soit sous forme de filaments pleins, ordinairement allongés et sinueux (4). On ne les voit en général qu'avec des méthodes particulières. Dans certains objets, les mitochondries ou chondriosomes sont visibles dans la cellule vivante (5); ce ne sont donc pas des formations artificielles.

On pense aujourd'hui que les mitochondries sont formées par la combinaison d'une substance protéique avec des lipoïdes (*Regaud, Fauré-Frémiet, Mayer et Schæffer*). Elles sont détruites ou modifiées par les fixateurs usuels contenant de l'acide acétique; il faut, pour les fixer, employer les bichromates ou les mélanges chromo-osmiques sans acide ou à peine acétifiés. On a une certaine tendance à considérer les mitochondries comme des états intermédiaires entre le protoplasma non différencié, et les produits différenciés de la cellule, grains de sécrétion, granulations vitellines ou graisseuses, myofibrilles, grains d'amidon, grains de chlorophylle, dont elles constitueraient les ébauches ou les appareils d'élaboration (6).

Les mitochondries des leucocytes ont été décrites par *Benda* (7), dans les leucocytes de l'homme, par *Dubreuil* (8) dans les lymphocytes du canal thoracique du chien, et par *Meves* (9) dans les lymphocytes des ganglions lymphatiques du lapin et du rat et dans les leucocytes de la couche corticale lymphoïde du foie de la salamandre. Les granulations décrites par *Schridde* (10) dans les lymphocytes du sang et des ganglions, avec la méthode d'Altmann, correspondent vraisemblablement à des mitochondries. Enfin une partie des granulations obtenues par

(1) Benda, *Verh. d. phys. Ges. zu Berlin*, 1899; *Archiv f. Anat. u. Phys.*, 1899; *Ergebnisse d. Anatomie und Entwickelungslehre*, XII, 1902.

(2) μιτος, fil, γονδρον, grain.

(3) Altmann, *Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen*, 1890.

(4) On tend à réserver le nom de *mitochondries* aux granulations disséminées, celui de *chondriomites* aux filaments formés de grains et celui de *chondriocontes* aux bâtonnets et filaments sinueux. Elles peuvent se présenter encore, exceptionnellement, sous forme de corps plus volumineux, sans forme régulière. Ces différents aspects peuvent se voir dans la même cellule. Le nom de *chondriome* a été donné à l'ensemble de ces grains et filaments considérés comme un appareil particulier dans une cellule.

(5) Guilliermond, *Archives d'an. microscopique*, XIV, 1912;
Fauré-Fremiet, *Archives d'an. micr.*, XI, 1910;
Duesberg et Hoven, *An. Anzeiger*, XXXVI, 1910;
Maximoff, *An. Anzeiger*, XLIII, 1913.

(6) Regaud, *S. de Biologie*, 5 juin 1909, et *Revue de médecine*, 1911; — Fauré-Frémiet, Mayer et Schaeffer, *S. de Biologie*, 5 juin 1909, et *Archives d'an. microscopique*, XII, 1910. — Mayer et Schaeffer, *S. de Biologie*, 28 juin 1913 — Guilliermond, *Revue gén. bot.*, XXX, 1918, et *Revue gén. des sciences*, 1921. — Regaud et Policard, *S. de Biologie*, 1 et 8 mars 1913.

(7) Benda, *Ergebnisse der Anatomie*, XII, 1902.

(8) Dubreuil, *S. de biologie*, 25 juin 1910, et *Archives d'an. microsc.*, XV, 1913.

(9) Meves, *Archiv f. mikr. Anatomie*, LXXV, 1910, et LXXXV, 1914.

(10) Schridde, *Münchener med. Woch.*, 1905, et *Ziegler's Beiträge z. path. Anatomie*, 1907. Maximoff, *Folia hæmatologica*, 1909.

Arnold (1) dans divers leucocytes au moyen de colorations vitales et désignés par lui sous le nom de *plasmosomes* correspond peut-être à des mitochondries.

C'est dans les leucocytes des Batraciens urodèles qu'il faut d'abord étudier les mitochondries. Le sang du triton et de la salamandre, la couche corticale lymphoïde du foie de la salamandre, le tissu conjonctif et les vaisseaux des larves de ces animaux sont d'excellents objets.

Une goutte de sang de triton ou de salamandre est étalée sur lame et fixée à l'état frais par un mélange chromo-osmique contenant très peu d'acide acétique (par exemple : acide chromique à 1 p. 100 : 15 cc. — acide osmique à 1 p. 100, 5 cc., acide acétique 2 à 3 gouttes,) et colorée énergiquement par l'hématoxyline au fer (2).

On peut aussi fixer la couche de sang dans un mélange bichromate-formol et colorer à l'hématoxyline au fer ; dans ce cas, la coloration à l'hématoxyline au fer doit être poussée plus longtemps et précédée au besoin d'un mordançage de quelques heures dans une solution de bichromate de potasse à 2,5 p. 100. On pourra aussi employer la coloration d'Altmann (fuchsine acide-acide picrique) soit après fixation par un mélange bichromate-acide osmique (bichromate de potasse à 2,5 p. 100 et acide osmique à 2 p. 100 à parties égales) soit après fixation par un mélange bichromate-formol et mordançage successif par le bichromate et par l'acide osmique.

La lame recouverte de sang est plongée dans le mélange suivant :

Bichromate de potasse à 2,5 p. 100.	90 v.
Formol du commerce	10 v.

On l'y laisse 12 heures ; on mordance ensuite dans une solution de bichromate à 2,5 p. 100 ; on lave, on plonge quelques instants (et jusqu'à 1 heure) dans une solution d'acide osmique à 1 p. 100 ; on lave et on colore dans la solution de fuchsine acide (20 grammes de fuschine acide dans 100 cc. d'eau anilinée saturée à froid) ; on chauffe doucement jusqu'à production de vapeurs et on décolore dans l'acide picrique (3).

Pour étudier les mitochondries des leucocytes dans les tissus, on se servira des méthodes de *Regaud* (4) (coloration à l'hématoxyline au fer après fixation par un

(1) J. Arnold, *Virchow's Archiv*, CXL, 1895 ; *Münchener med. Woch.*, 1906.

(2) On peut se servir aussi des mélanges faibles de Flemming dont on diminue la proportion d'acide acétique. On peut obtenir les mitochondries colorées dans un leucocyte fixé pendant ses mouvements en laissant la préparation de sang frais quelques instants dans une chambre humide contenant de l'eau salée, avant de la fixer (Voir Meves, *Archiv f. mikr. Anatomie*, LXVIII, 1906, et LXXV, 1910).

(3) Meves, *Archiv f. mikr. Anatomie*, LXXV, 1910. Voir aussi Meves et Duesberg, *Archiv f. mikr. Anatomie*, LXXI, 1908.

(4) Les pièces sont fixées dans le mélange suivant :

Bichromate de potasse à 3 p. 100	80 v.
Formol commercial.	20 v.

pendant un jour au moins. Sans lavage, mordancer ensuite les pièces dans une solution de bichromate de potasse à 3 p. 100 pendant une semaine. Laver les pièces à l'eau courante pendant un jour. Couper à la paraffine. Mordancer à l'alun de fer. Colorer avec :

Hématoxyline	1 gramme.
Alcool absolu	10 cc.

Ajouter :

Glycérine	10 cc.
Eau distillée.	80 cc.

Les coupes surcolorées et rincées à l'eau sont différenciées dans une solution d'alun

melange bichromate-formol), de *Meves* (coloration à l'hématoxyline après fixation par un mélange chromo-osmique), d'*Altmann* (coloration à la fuchsine acide après fixation par un mélange bichromate-acide osmique) et de *Benda* (coloration au violet cristal après fixation par un mélange chromo-osmique.) Ces colorations seront employées sur des coupes à la paraffine de très petits fragments.

Fig. 164. — Couche corticale lymphoïde du foie de larve de salamandre. Mélange de Flemming ; coloration des mitochondries par la méthode de Benda (alizarine au fer, violet cristal). Dans l'incurvation du noyau, on voit la centrothèque ; les centrioles ne sont pas colorés. D'après Meves.

Dubreuil a recommandé, pour les leucocytes de la lymphe et des sérosités, l'emploi de la méthode de *Barjon et Regaud :* dépôt de la goutte de lymphe dans une solution d'acide osmique à 1 p. 100 ; centrifugation, enrobage du culot dans une solution très faiblement sirupeuse de celloïdine dont une goutte est ensuite étalée sur lame et coagulée par immersion dans l'alcool à 80° ; coloration à l'hématoxyline au fer.

Les préparations du sang de Triton et de Salamandre traitées par une des méthodes indiquées plus haut, montrent les mitochondries vivement colorées dans les leucocytes, alors que le noyau l'est très faiblement. Les mitochondries affectent indistinctement la forme de grains, de filaments pleins, minces et sinueux, ou de chapelets de grains ; on peut trouver ces trois aspects dans la même cellule. Ces diverses formes de mitochondries peuvent se rencontrer indistinctement dans les divers leucocytes. Dans les lymphocytes, les mitochondries sont moins nombreuses parce que le protoplasma est moins abondant ; les leucocytes à noyau polymorphe des Batraciens ne contiennent pas de granulations acidophiles, les mitochondries s'y voient facilement. Sur ceux de ces leucocytes qui ont été saisis par le fixateur pendant leurs mouvements, on voit les mitochondries entraînées dans les pseudopodes. Dans les grands leucocytes à noyau réniforme, les mitochondries se trouvent surtout dans le sinus du noyau ; les chondriocontes sont parfois disposés d'une façon radiée autour du centrosome sans se confondre avec les filaments de la sphère. Dans les leucocytes à granulations éosinophiles, les mitochondries sont rares ou n'existent pas.

Fig. 165. — Larve de salamandre. Leucocyte du sang fixé pendant ses mouvements. Mélange de Flemming, hématoxyline au fer. Mitochondries. Dans la portion épaisse du pseudopode, les mitochondries sont rassemblées autour de la sphère (claire) qui contient deux centrioles. D'après Meves.

de fer à 5 p. 100 sous le contrôle du microscope, lavées à l'eau courante, déshydratées et montées au baume (Regaud, *S. de Biologie*, 19 décembre 1908, et *Revue de médecine*, 1911). Dans la méthode d'Altmann-Schridde, les coupes de tissus fixés par un mélange bichromate-formol sont placées 1 heure dans une solution d'acide osmique à 1 p. 100, lavées a l'eau distillée, colorées à chaud 10 minutes dans une solution de fuchsine acide à 20 p. 100 dans l'eau anilinée, différenciées à l'alcool et montées au baume (Cf. Schridde, *Münchener med. Woch*, 1905 ; — Schridde et Naegeli, *hämatologische Technik*, 1921).

Chez les Mammifères et chez l'homme, les mitochondries des leucocytes peuvent être mises en évidence par les mêmes méthodes, bien qu'avec plus de difficultés. Dans les lymphocytes des Mammifères (ganglions, canal thoracique) (*Meves*, *Dubreuil*), les chondriosomes semblent n'exister qu'à l'état de grains.

La transformation directe des mitochondries en grains de sécrétion a été montrée dans un grand nombre d'objets. On n'a pas encore démontré leur transformation en granulations leucocytaires, ce qui est du reste une hypothèse très plausible étant donné surtout leur rareté dans les leucocytes à granulations éosinophiles.

Fig. 166. — Sang d'homme. Mélange chromo-osmique, hématoxyline. Leucocyte montrant un double centriole dans l'incurvation du noyau. 1.300 diam.

Corpuscules centraux. — On sait qu'il existe, dans de nombreuses cellules, des corpuscules très fins, colorables par les colorants nucléaires énergiques après l'action de fixateurs peu acidifiés et de mordants, et qui, lorsque la cellule se divise, sont des centres d'orientation du mouvement de division. Dans la cellule au repos, ces corpuscules extrêmement petits (centrosomes ou centrioles) sont en général au nombre de deux ; ils sont rapprochés ; au moment où la cellule se divise, ils s'écartent, occupent finalement les deux pôles, réunis par les filaments du fuseau et c'est vers chacun d'eux que se dirigent les chromosomes pour reconstituer un noyau-fille. Les corpuscules centraux existent aussi dans les leucocytes, et chose curieuse, même dans ceux qui ne semblent plus aptes à subir la division indirecte. Ils ont été découverts en 1891 par *Flemming* (1). Ils sont petits et difficiles à voir. Bien qu'on puisse les observer dans le sang et les tissus hémopoiétiques de l'homme et des mammifères, il vaut mieux, pour les étudier, s'adresser au sang et aux tissus des Batraciens Urodèles, dans lequel ils sont plus faciles à mettre en évidence. On fixe sans dessiccation, par un mélange chromo-osmique contenant très peu d'acide acétique, du sang de triton ou de salamandre et on colore, soit par l'hématoxyline au fer énergiquement, soit par l'hématéine après mordançage par la teinture d'iode, soit par la safranine ou par la coloration combinée safranine-gentiane-orange. La préparation est montée au baume après éclaircissement et sans avoir subi de dessiccation. On observe de préférence des leucocytes dont le noyau est incurvé. Dans la dépression, le protoplasma a un aspect spécial et forme un champ plus coloré (ou quelquefois plus clair). Ce champ correspond à la *sphère attractive ;* quelquefois le champ clair est limité par une zone annulaire plus foncée, la *centrothèque*. Au centre de la sphère se trouvent, vive-

Fig. 167. — Sang de triton. Mélange chromo-osmique. Hématoxyline au fer. Leucocyte polynucléaire dont les lobes sont complètement séparés. On distingue un double centriole. 830 diam.

(1) W. Flemming, *Archiv f. mikr. Anatomie*, XXXVII, 1891.

M. Heidenhain, *Verh. der an. Gesellschaft. Ver. Göttingen*, 1893. — Siedlecki, *Ac. des sc. de Cracovie*, 1895.

Meves sur les leucocytes de la salamandre, Weber (*S. de biologie*, 1er février 1913) sur les leucocytes du congyle, ont montré que les petits corpuscules décrits par *Heidenhain* sur les filaments astériens ne sont probablement autre chose que des mitochondries.

ment colorés, des corpuscules très fins au nombre de deux, quelquefois plus nombreux. On tend aujourd'hui à réserver le nom de *centrosome* ou de *corpuscule central* ou de *microcentre* à l'ensemble des points colorés et à donner à ces points colorés le nom de *centrioles*. Du centrosome partent des filaments radiés, les *filaments radiés de la sphère*, qui s'avancent plus ou moins loin dans la cellule, mais ne dépassent pas en général beaucoup les limites de la sphère ; contrairement aux descriptions et aux figures classiques de *Heidenhain*, ils n'atteignent pas le bord du leucocyte et ne paraissent pas segmentés. Ces filaments radiés sont les mêmes que ceux qui partent de chaque centrosome polaire dans la cellule en division, en plus du fuseau qui réunit les deux centrosomes. Ces filaments ne sont pas un artifice de préparation ; dans les leucocytes, ils sont trop fins, trop peu développés pour être visibles à l'état vivant ; mais sur des objets appropriés, par exemple, sur les œufs volumineux d'oursins ou de nématodes, on peut les observer sur la cellule vivante, en train de se diviser. Que ces radiations soient constituées par des filaments résistants ou par de simples lignes de force mettant en séries linéaires les granulations protoplasmiques, l'aspect correspond à une réelle structure.

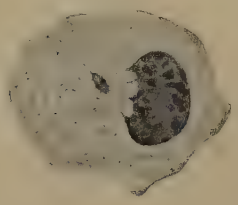


Fig. 168. — Leucocyte de la cavité générale d'un annélide polychète (*Ophelia bicornis*) montrant un centrosome contenant deux centrioles. D'après Henneguy.

Dans les leucocytes du sang, malgré l'emploi d'une technique appropriée et d'objets favorables, centrosomes et radiations sont assez difficiles à observer. On les verra plus facilement dans les tissus hémopoiétiques fixés par les mélanges chromo-osmiques et bichromate-sublimé-formol et colorés par les méthodes indiquées plus haut. Un objet de choix est le tissu lymphoïde cortical du foie de la salamandre. La sphère et le centrosome, dans la cellule au repos, se trouvent toujours dans le sinus formé par l'incurvation du noyau. Dans les noyaux polymorphes, ils sont au centre de l'anneau ou du fer à cheval formé par le cordon nucléaire segmenté.

Fig. 169. — Couche corticale lymphoïde du foie de la salamandre maculée. Cellule lymphoïde en mitose. Centrosome. Mélange chromo-osmique. Safranine. 1.100 diam.

PROPRIÉTÉS PHYSIOLOGIQUES DES LEUCOCYTES

Mouvements amiboïdes. — Le phénomène le plus remarquable que présentent les leucocytes examinés vivants dans le sang frais consiste dans leurs changements de forme spontanés. Ces mouvements, par comparaison avec ceux des amibes, ont été nommés amiboïdes (1).

Les mouvements amiboïdes des leucocytes doivent être étudiés

(1) Ces mouvements ont été découverts en 1846 par *Warthon Jones*. Quelques années plus tard, Davaine (*S. de Biologie*, 1850, p. 103, et *l'Œuvre*, p. 580), sans connaître les observations de *W. Jones*, les retrouva et les décrivitavec une exactitude aussi parfaite.

d'abord dans le sang et dans la lymphe des animaux à température variable.

Lymphe de la grenouille. — On trouve sous la peau de la grenouille, de grandes cavités lymphatiques qui communiquent les unes avec les autres, séparant le tégument des plans musculaires sous-jacents et qu'on appelle *sacs lymphatiques*. Il existe un certain nombre de ces sacs, dont les principaux se trouvent sous la peau de la région dorsale et sous la peau de la cuisse. Ils communiquent avec d'autres sacs lymphatiques profonds et avec les autres parties du système lymphatique (voir ch. XVIII). Ils contiennent de la lymphe qu'il est facile de recueillir avec une pipette après avoir fait, au fer rouge, une petite ouverture à la peau. La quantité de lymphe qui existe dans les sacs lymphatiques sous-cutanés est toujours peu considérable et peu riche en leucocytes. Il vaut mieux recueillir celle qui est située dans la cavité péritonéale ou dans le sac péricardique, après avoir pratiqué à la peau et à la paroi abdominale une ouverture au fer rouge. Pour recueillir la sérosité du sac péricardique, on prolonge l'incision jusqu'à l'appendice xyphoïde qu'on soulève avec une pince et qu'on sectionne ; on met le cœur à nu en ayant bien soin de ne pas ouvrir le péricarde. Celui-ci contient une lymphe transparente, ordinairement riche en leucocytes très actifs et qu'on recueille avec une pipette effilée.

La goutte de lymphe est déposée sur le plateau d'une chambre à air ; on recouvre d'une lamelle, on lute à la paraffine et on observe à la température du laboratoire. Si on examine la préparation au moment où elle vient d'être faite, la plupart des globules blancs apparaissent sphériques ; mais peu d'instant après, leur forme s'est modifiée et a pris les aspects les plus variés. Pour se rendre compte que les changements de forme sont dus à des mouvements spontanés, on s'habitue d'abord à dessiner un même leucocyte à la chambre claire, à des intervalles successifs et rapprochés ; on arrive assez rapidement à n'avoir plus besoin de cet artifice pour voir réellement les changements de forme et les mouvements.

Différents aspects du mouvement pseudopodique. — Si on observe un leucocyte sphérique, on voit d'abord apparaître sur un des côtés de la cellule une petite saillie, un mince prolongement rectiligne qui s'allonge lentement jusqu'à atteindre le diamètre de la cellule ou davantage ; puis il se rétracte. Un nouveau prolongement ou pseudopode apparaît en un autre point et quelquefois, deux ou trois apparaissent ainsi pour se rétracter successivement. Ce mouvement est le *mouvement pseudopodique*. Après l'émission et la rétraction de pareils pseudopodes, il arrive souvent que la cellule en émet un autre plus volumineux qui s'élargit en même temps qu'il s'allonge. La cellule se rétracte du côté opposé et toute sa masse semble passer dans le pseudopode ; finalement, la cellule s'est déplacée dans le sens où le pseudopode s'était allongé, et d'une quantité égale à cet allongement. Si le même phénomène se repro-

duit et toujours dans la même direction, le leucocyte se déplace et progresse à la façon d'une amibe.

Fig. 170. — Lymphe péritonéale de la grenouille. Lymphocytes fixés pendant leur activité. Émission de pseudopodes (Jolly, 1898). 300 diam.

A côté de ces pseudopodes effilés ou massifs, la cellule en émet quelquefois d'autres ayant la forme d'une mince nappe de protoplasma qui s'étale sur un des côtés de la cellule. Ce sont les *pseudopodes en nappe*. Du reste, toutes les variétés d'aspect existent, et le protoplasma du leucocyte en mouvement se transforme à chaque instant. Très souvent, les pseudopodes sont émis à un seul pôle et au même pôle ; c'est ce qui cause le déplacement. Souvent encore les pseudopodes sont émis de différents côtés, avec prédominance en un point. Enfin, certains leucocytes émettent des pseudopodes filamenteux, d'une finesse extrême, très nombreux, qui partent en rayonnant de tous côtés et rappellent ceux qu'émettent les Rhizopodes.

Fig. 171. — Sang de triton. Deux lymphocytes fixés pendant leurs mouvements ; pseudopodes en nappe et pseudopodes en aiguille. 1.000 diam.

Quand on examine avec attention, à un très fort grossissement, le bord d'un pseudopode en nappe, on reconnaît que ce bord n'est pas toujours linéaire, mais qu'il présente souvent une dentelure très découpée, formée par des pseudopodes secondaires, dont la finesse est extrême et qui donnent au bord du pseudopode l'aspect d'une bordure ciliée.

Il est d'autres leucocytes qui, au lieu d'émettre des pseudopodes, s'étalent régulièrement comme une goutte d'huile et arrivent à recouvrir une surface beaucoup plus grande que celle qu'ils recouvraient d'abord. La lame de protoplasma ainsi formée est si mince qu'elle arrive à échapper à l'observation.

Fig. 172. — Triton crêté. Lymphe péritonéale. Leucocyte fixé *in vitro* pendant ses mouvements. Pseudopodes en aiguille. Mouvements rhizopodiques. 830 diam.

Les leucocytes qui forment des pseudopodes en aiguilles ou en nappes, ou qui s'étalent en une mince lamelle, adhèrent assez fortement à la lame de verre ; les courants de liquide ne les déplacent pas. Cette adhérence est due à la nudité et à la fluidité de leur protoplasma (1).

(1) Max Schultze, *Archiv f. mikr. Anatomie*, I, 1865.

Elle se manifeste déjà sur des leucocytes qui ont gardé leur forme globuleuse, et si l'observation est faite sur une préparation de sang, on constate que cette propriété appartient aux leucocytes et non aux hématies.

L'étalement sur les surfaces n'est pas une simple propriété physique ; c'est le résultat d'un mouvement protoplasmique actif par lequel un pseudopode en nappe, circulaire, s'étend tout autour de la masse cellulaire principale. De la même façon, les leucocytes s'étalent à la surface interne des vaisseaux, à la surface des corps étrangers volumineux qu'ils peuvent arriver à envelopper complètement. C'est dans cette propriété générale qu'on trouve l'explication du mécanisme de la phagocytose.

Fig. 173. — Triton crêté. Lymphe péritonéale. Leucocyte fixé *in vitro* pendant ses mouvements. Pseudopodes en aiguille. 830 diam.

L'adhérence du leucocyte est nécessaire pour sa progression ; mais elle n'est pas absolument indispensable pour l'émission des pseudopodes. Dans la lymphe examinée dans la chambre à air, on observe des leucocytes qui s'étalent sur le plan de la chambre, d'autres qui s'étalent sur la face inférieure de la lamelle. Parmi ces derniers, quelques-uns s'allongent vers le bas et arrivent à adhérer par leur pied à la paroi inférieure de la chambre ; ils se trouvent ainsi tendus à travers toute la hauteur de celle-ci.

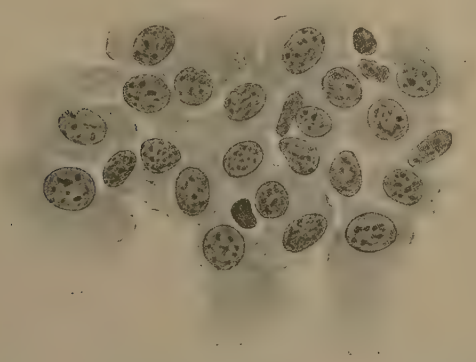


Fig. 174. — Lymphe péritonéale du triton. Cellules lymphoïdes libres qui, *in vitro*, se sont étalées et ont formé une couche dont l'aspect rappelle celui d'un endothélium. Elles ont été ensuite fixées et colorées. 270 diam.

Lymphe des Urodèles. — L'étalement des leucocytes se verra encore mieux si l'on prend comme objet la lymphe péritonéale d'un Triton crêté. Ici, il n'existe pas de sacs lymphatiques sous la peau ; l'abdomen est cautérisé au fer rouge ; à travers le petit eschare formé, on fait pénétrer la pointe de la pipette. Dans cette lymphe, on trouve des leucocytes de petite taille qui poussent des pseudopodes en aiguilles, de volumineuses cellules paraissant immobiles, bourrées de granulations réfringentes ; enfin, des cellules à protoplasma clair, à noyau arrondi, dont la plupart, au lieu d'émettre des pseudopodes, s'étaleront en

nappe. Le lendemain de la ponction, la lymphe, recueillie sur le même animal, contiendra un grand nombre de leucocytes à noyau polymorphe, très mobiles ; ce sont là de nouvelles cellules, venues des vaisseaux sanguins et dont l'arrivée a modifié complètement la composition histologique de la sérosité. Ces nouvelles cellules ont une mobilité très grande ; cette lymphe enflammée, qu'on peut obtenir de la même façon chez la grenouille, est un excellent objet pour l'étude des mouvements amiboïdes.

Sang des Batraciens. — L'observation des mouvements se fera aussi très bien dans une préparation de sang frais d'un batracien. Dans le sang du triton, de la salamandre, de l'axolotl, le noyau des leucocytes vivants se voit facilement ; on constatera facilement que l'activité des différents leucocytes n'est pas la même. Les lymphocytes présentent surtout des mouvements pseudopodiques, rarement étendus à toute la cellule. Les leucocytes qui présentent les mouvements amiboïdes les plus vifs, avec reptation, sont les leucocytes à noyau polymorphe. Les leucocytes à granulations réfringentes (les leucocytes éosinophiles) sont aussi animés de mouvements très vifs ; leur observation permet de suivre les granules entraînés par le mouvement du protoplasma jusque dans l'intérieur des pseudopodes ; ces mouvements passifs donnent une bonne idée des remaniements continus que subit l'ensemble de la masse protoplasmique (1).

Influence de la température sur les mouvements des leucocytes. — Les leucocytes de la lymphe et du sang des Batraciens et des autres animaux à température variable présentent des mouvements à la température extérieure du laboratoire et dans des limites très étendues. Ces mouvements sont influencés d'une manière remarquable par la température. Modérés à 15°, ils deviennent beaucoup plus actifs vers 20-25°.

Platines chauffantes. — Pour étudier avec précision cette influence de la température extérieure, il est nécessaire de pouvoir la faire varier à volonté. On se sert à cette fin de surplatines chauffantes qu'on applique sur la platine du microscope. Le premier de ces instruments est dû à *Max Schultze :* c'est une simple lame métallique présentant un prolongement s'avançant en dehors de la platine et pouvant recevoir la flamme d'une lampe à alcool ou la flamme veilleuse d'un brûleur Bunsen. La platine chauffante de *Malassez* (2), est également à conduction de chaleur métallique ; mais ici, la préparation, au lieu de reposer simplement sur la platine, est enfermée dans une petite chambre métallique qui contient également le thermomètre. La préparation est donc environnée d'air chaud de toutes parts et sa température se maintient plus égale. Le réglage se fait en faisant varier la flamme ou en l'approchant plus ou moins. Dans l'excel-

(1) Il sera utile de comparer les mouvements des leucocytes à ceux des amibes. On trouve presque toujours des amibes dans les amas gélatineux qui se forment en été dans les réservoirs où l'eau n'est pas renouvelée, et à l'intérieur des robinets. Voir aussi Le Dantec, *S. de Biologie*, 2 février 1909, et Langeron, *Précis de microscopie*. On étudiera aussi, comme éléments de comparaison, les courants protoplasmiques internes des cellules végétales (poils staminaux de *Tradescantia*, etc.).

(2) Malassez, *S. de Biologie*, 6 juillet 1886 et *Archives de physiologie*, 1886.

lente platine de *Vignal*, la température est maintenue fixe par un régulateur imité de celui de d'Arsonval (1).

On pourra encore utiliser la surplatine chauffante de *Ranvier*, à circulation d'eau chaude, et la platine électrique de *Regaud*. On pourra aussi placer le microscope tout entier dans une petite chambre-étuve, imitée de celle de *Sachs*. Cette disposition est excellente et permet d'obtenir une température très constante. Dans le cas où l'on ne disposerait pas d'une platine chauffante, on pourrait utiliser la chaleur dégagée d'une ampoule électrique qui, placée tout près de la platine, permettra d'élever la température de la préparation à un degré suffisant.

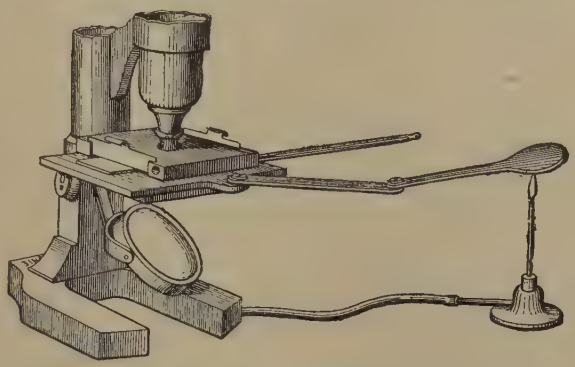


Fig. 175. — Platine chauffante de Malassez.

Pour étudier l'influence des températures basses, on s'adressera aux mélanges réfrigérants. Une glacière en zinc, à double paroi, est munie sur l'une de ses faces, d'une petite ouverture vitrée qui permet à la lumière d'arriver directement sur le miroir du microscope (2). La glacière est contenue elle-même dans une caisse de bois ; l'intervalle est rempli avec de la sciure ou toute autre substance isolante. L'ouverture supérieure de la caisse de zinc qui reçoit le microscope est fermée avec du liège. La vis micrométrique de l'instrument est prolongée en haut par une pièce métallique. L'obturation peut être complète : seuls l'oculaire, le bouton de la vis micrométrique et la tige du thermomètre dépassent le niveau de la plaque de liège. C'est par l'obturation plus ou moins complète de la chambre réfrigérante qu'on essaiera de régler la température. Il est assez difficile d'obtenir exactement une température déterminée à l'avance. On devra se contenter de noter la température à laquelle l'observation a été faite.

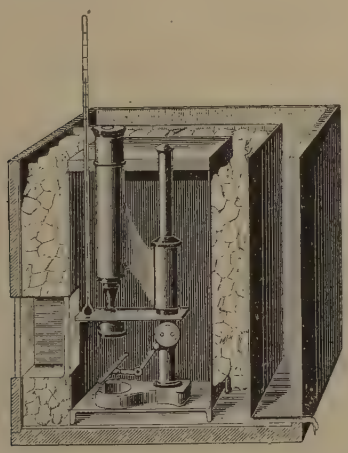


Fig. 176. — Chambre froide pour les observations microscopiques faites à basse température.

(1) Vignal, *S. de Biologie*, 25 avril 1885 et *Archives de physiologie*, 1885.
(2) Jolly, *Archives d'anatomie microsc.*, VI, avril 1904.

Limites de température. Mouvements amiboïdes chez les Homéothermes. — Chez les Batraciens, les mouvements des leucocytes peuvent être observés de 0° à 37°. L'optimum paraît être de 25° à 30°. Les leucocytes ne résistent pas à une température prolongée de 38°; par contre, ils semblent pouvoir supporter des températures inférieures à 0°.

Pour étudier les mouvements des leucocytes des homéothermes, le mieux est d'observer une simple préparation de sang frais. Ces leucocytes exigent naturellement, pour manifester leur activité, des limites de température beaucoup plus étroites. Toutefois, les mouvements des leucocytes de l'homme et des Mammifères se voient déjà à la température du laboratoire et ils peuvent se prolonger à une température beaucoup plus basse. La limite inférieure compatible avec leur vie est très basse et voisine de ce qu'elle est chez les Batraciens. Une préparation de sang de mammifère refroidie à 0° et reportée à 15° montre des leucocytes intacts. La température maxima est plus élevée que chez les Batraciens, mais elle ne dépasse guère 45°.

Évaluation de la vitesse du mouvement leucocytaire. — Si l'on veut établir d'une manière plus exacte la courbe de l'activité protoplasmique des leucocytes aux différentes températures, il faut chercher à évaluer la vitesse de ces mouvements. A ce point de vue, on peut distinguer : un mouvement protoplasmique interne appréciable par la vitesse de déplacement des granules et que l'on suit avec la plus grande facilité dans les leucocytes granuleux du sang du cheval; un mouvement pseudopodique, très variable d'aspect, et qui, souvent, se confond complètement avec le mouvement protoplasmique interne, puisque les leucocytes n'ont pas de membrane ; enfin, un mouvement de progression, de reptation, dû à des extensions pseudopodiques se faisant dans le même sens et coïncidant avec des contractions du pôle opposé.

Les mouvements protoplasmiques et pseudopodiques sont assez rapides ; ils se rapprochent du mouvement protoplasmique qu'il est facile d'observer dans certaines cellules végétales ; leur vitesse est cependant un peu inférieure. Le mouvement de progression totale de la cellule est beaucoup plus lent. Pour évaluer sa vitesse, on dessine à la chambre claire, à un grossissement connu (500 diam., par exemple), et à intervalles de temps rapprochés (une demi-minute), les contours d'un leucocyte (1) ; on réunit les centres de figure et on mesure la longueur de la ligne sinueuse ainsi obtenue.

La vitesse croît nettement avec la température. A température égale, les leucocytes des animaux à sang froid semblent pourtant un peu moins vifs que ceux des Mammifères, au moins aux températures élevées. Ces mouvements sont très lents : pour les leucocytes du sang de l'homme, à 37°, la progression n'est guère que de 15 μ à la minute (1 mm. à l'heure en ligne sinueuse). On comprend par là

(1) Le papier, le microscope, la préparation sur la platine et la chambre claire sur le microscope, ne doivent naturellement subir pendant ce temps, aucun déplacement. Voir Jolly, *S. de Biologie*, 8 mars 1913.

les conséquences de la diapédèse. Un leucocyte qui, dans nos tissus, ne pourra, tout au plus, que parcourir 1 à 2 centimètres en vingt-quatre heures, en admettant une marche constante en ligne droite et sans arrêt, pourra, grâce à la circulation sanguine et à la diapédèse, être transporté en quelques minutes d'un point du corps à un point opposé (1).

La vitesse du mouvement des leucocytes peut être appréciée plus exactement encore par la cinéphotographie. Connaissant l'intervalle de temps qui sépare les prises de vue successives, il est facile de mesurer sur les épreuves le chemin parcouru par une cellule dans l'unité de temps. La projection cinématographique de ces images sur l'écran permet, en multipliant fortement la vitesse, de donner une idée saisissante de ces mouvements. Pour les leucocytes du sang de l'homme, *Comandon* (2), par l'enregistrement cinématographique, a obtenu 9 μ 6 par minute à 25°, 20 μ 4 à 30° et 25 μ 2 à 35°.

Action de l'oxygène. — L'air atmosphérique, par l'oxygène qu'il contient est, comme la chaleur, un excitant du mouvement des leucocytes (3). Si on examine une préparation de lymphe de grenouille lutée depuis vingt-quatre heures, on observe que les cellules situées au centre de la préparation sont immobiles tandis que celles qui sont situées à la périphérie, c'est-à-dire près de la réserve d'air, sont encore mobiles. Si on soumet cette préparation à une température de 25°, on réveille des mouvements dans certaines des cellules qui en étaient privées. De plus, si on fait deux préparations de lymphe, l'une entre lame et lamelle sans réserve d'air, l'autre dans la chambre humide avec réserve d'air, on constate qu'au bout de quarante-huit heures, il y a beaucoup plus de leucocytes altérés dans la première préparation que dans la seconde. Les leucocytes morts montrent leur noyau très apparent, réfringent, et l'élévation de température ne parvient pas à y réveiller des mouvements.

Action de la lumière et des diverses radiations. — La température et l'oxygène ne sont probablement pas les seules causes capables d'influencer le mouvement des leucocytes, mais ce sont les seules que nous connaissions bien. On sait que la lumière exerce une action sur certains mouvements protoplasmiques, comme ceux des granules de chlorophylle, des cellules pigmentaires ; jusqu'ici, les

(1) Malgré sa lenteur, ce mouvement de reptation est très facilement observé. Dans l'appréciation de la vitesse par notre œil intervient la grandeur de l'objet qui se meut, grandeur qui, au microscope, est naturellement le diamètre apparent. Un leucocyte avance de un demi-diamètre à 2 diamètres environ à la minute. C'est à peu près ce que font les mollusques terrestres en rampant.

(2) Comandon, *S. de Biologie*, 13 décembre 1919 et *Annales Pasteur*, 1920.

(3) Ranvier, *Traité technique d'histologie*.

expériences faites sur l'action de la lumière sur les leucocytes sont restées à peu près négatives (1).

Les nouvelles radiations (rayons X, radium) semblent avoir une influence désastreuse sur les leucocytes, si l'on s'en rapporte aux résultats données par l'irradiation du tissu lymphoïde (voir chap. XVII). Il est possible qu'à des doses très faibles, ces agents physiques soient, au contraire, des excitants du mouvement protoplasmique.

Quant aux agents chimiques capables d'accélérer les mouvements des leucocytes, ils sont encore peu connus. *Athanasiu* et *Carvallo* (2) ont attribué cette action à la peptone : ils mélangent le sang (grenouille, chien) avec une solution de peptone Witte à 10 p. 100 et trouvent les mouvements des leucocytes accélérés. J'ai refait l'expérience avec le sang de l'homme, du lapin : les mouvements des leucocytes sont conservés, mais ils ne sont pas accélérés. On a, par contre, souvent attribué à la peptone une action leucolytique. En réalité, les solutions de peptone, en eau salée isotonique, à des degrés de concentration variés, n'empêchent nullement *in vitro*, les mouvements amiboïdes des leucocytes, au moins pendant quelques heures, et par conséquent, ne les tuent pas (voir chap. VII) (3).

Anesthésiques, quinine. — Certains auteurs auraient obtenu l'arrêt des leucocytes à l'aide des anesthésiques. Si on endort un animal par le chloroforme ou par l'éther, on constate, en réalité, en prélevant une goutte de son sang, que les leucocytes sont parfaitement mobiles (4). *Demoor* mélange, *in vitro*, la lymphe de grenouille à de l'eau chloroformée et observe de cette façon l'action inhibitrice du chloroforme et le retour des mouvements avec l'addition d'eau salée (5). En réalité, avec une pareille méthode, on ne produit que des altérations et des destructions. Il faut agir moins brutalement, sans mettre les leucocytes directement en contact avec de l'eau chloroformée. On se sert d'une petite chambre à gaz à laquelle est adaptée d'un côté un siphon qui, par écoulement d'eau, produit un appel d'air

(1) Cependant, d'après les expériences de Policard et Leriche, la lumière exercerait une action chimio-tactique négative sur ces éléments. *S. de Biologie*, 22 décembre 1917.

(2) *S. de biologie*, 21 mars 1896.

(3) Jolly, *S. de Biologie*, 20 juillet 1918. Voir aussi Dastre, Henri et Stodel, *S. de Biologie*, 14 novembre 1903. Il faut naturellement ajouter au sang l'eau salée peptonée en petites proportions, sans quoi on a les effets nuisibles de l'eau salée.

(4) Cl. Bernard avait déjà remarqué que les leucocytes du sang d'un animal empoisonné par l'oxyde de carbone avaient conservé leur mobilité. Jusqu'ici, on n'a pas démontré avec certitude que les leucocytes d'un animal anesthésié ou endormi par l'opium fussent moins actifs que ceux d'un animal témoin (voir ch. VII).

(5) Demoor, *Archives de Biologie*, 1895.

chargé de vapeurs de chloroforme. Dans ces conditions, on n'obtient que des résultats négatifs : ou bien, les leucocytes sont inaltérés et conservent leurs mouvements, ou bien les vapeurs de chloroforme les altèrent définitivement et les tuent sans qu'un retour d'air normal puisse les revivifier. La morphine, l'atropine, la cocaïne, etc., semblent agir de la même façon.

Il y a longtemps que *Binz* (1) a annoncé que la quinine immobilisait les leucocytes *in vitro*. Les résultats contradictoires qui ont été publiés à ce sujet s'expliquent par ce fait que les sels de quinine ne suspendent pas l'activité des leucocytes, mais tuent simplement ces cellules, *in vitro*, lorsque la dose est suffisante (2).

Action de l'électricité. Action de l'eau. — Les leucocytes peuvent être tués *in vitro* par des décharges d'induction. D'après *Ranvier* (3) des décharges de faible intensité augmentent leur activité. Des décharges plus fortes peuvent les paralyser et les ramener à la forme ronde ; quelque temps après, ils pourraient de nouveau reprendre leurs mouvements. Une action plus énergique du courant les tuent et le noyau apparaît dans leur intérieur.

L'addition d'eau à une préparation de lymphe ou de sang gonfle les leucocytes qui deviennent sphériques, transparents ; le noyau apparaît nettement. Ces altérations, que nous étudierons en détail un peu plus loin, sont définitives. Elles se produisent beaucoup plus lentement si on ajoute à l'eau du chlorure de sodium en proportion convenable.

Action des solutions salées. — Pour étudier *in vitro* l'action de substances toxiques sur les leucocytes, on a été souvent tenté d'incorporer ces substances à des solutions salines indifférentes ; mais les milieux artificiels, même isotoniques, altèrent en général rapidement la vitalité des leucocytes. Il est cependant possible d'observer pen-

(1) C. Binz, *Archiv. f. mikr. Anatomie*, III, 1867, et *Archives int. de pharmacodynamie*, IV, 1898. — Laveran, *Traité du paludisme*, Paris, 1898. — Uhlmann, *Zeigler's Beiträge*, 1896.

(2) Il faut employer des doses assez fortes (solution à 1 p. 1.000). Il faut utiliser les sels basiques et non les sels acides dont le dédoublement est capable de mettre en liberté une certaine quantité d'acide, très nuisible aux leucocytes. Beaucoup d'auteurs ont cherché à paralyser *in vivo* les leucocytes en employant des anesthésiques ou des toxiques généraux. Cantacuzène, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1898 ; Gheorghiewsky, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1899 ; Vaillard et Vincent, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1891. Voir ch. vii. Beaucoup de ces observations devraient être refaites *in vitro*. En général, à dose suffisante, *in vitro*, les toxiques et anesthésiques tuent les leucocytes, mais ne les paralysent pas. Voir les expériences analogues faites sur les infusoires (Fabre-Domergue, *Annales de sc. naturelles*, Zoologie, t. V, 1888).

(3) Ranvier, *Leçons sur la cornée*, Paris, p. 287.

dant un certain temps, les mouvements amiboïdes des leucocytes dans le sang dilué avec des solutions salées. Le mélange est fait à la température du laboratoire, avec une pipette graduée et à un titre connu (1). Une goutte du mélange est déposée sur le plateau de la chambre humide ; on recouvre d'une lamelle et on lute à la paraffine. S'il s'agit de sang de mammifère ou d'oiseau, on porte la préparation sur la platine chauffante. L'expérience montre que la concentration moléculaire de la solution employée importe beaucoup.

En employant des solutions à 9 p. 1.000 pour l'homme et les Mammifères et à 6 p. 1.000 pour les Batraciens et Reptiles, on peut observer constamment, à la température convenable, un certain nombre de leucocytes présentant des mouvements actifs dans des mélanges de sang et d'eau salée à 1/10, 1/20, 1/50 et même à 1/100. Avec des dilutions plus grandes, les résultats sont moins nets ou négatifs. Dans les mélanges qui ne dépassent pas 1/100, les mouvements, quelquefois très actifs, peuvent durer huit à dix heures. Le nombre des globules qui, dans chaque préparation, présentent ces phénomènes de vie est variable. Après vingt-quatre heures, la préparation montre toujours les leucocytes altérés (2).

A coté de la concentration moléculaire, la qualité des substances salines employées a une certaine importance. Toutefois, on n'observe pas de différences bien considérables en remplaçant la solution chlorurée isotonique par les liquides de Locke et de Ringer.

Il ne faudrait pas conclure de ces expériences que les solutions salées sont des milieux favorables à la vitalité des globules blancs. Tout ce qu'on peut dire, c'est que dans des conditions convenables, c'est-à-dire dans des solutions isotoniques déterminées, on peut observer des mouvements vitaux d'un certain nombre d'entre eux.

(1) Le mélangeur Potain employé pour la numération des éléments figurés du sang, convient très bien.

(2) J. Jolly, *S. de Biologie*, 17 juillet 1897. La concentration de la solution salée et aussi le titre du mélange sang et eau salée, doit varier suivant les espèces. Voir plus loin les expériences de Hamburger concernant l'action de la pression osmotique sur la phagocytose. Dans les expériences faites avec des solutions salées de titre variable, on constate que les leucocytes sont plus résistants que les hématies. Toutefois il faut bien se rappeler que l'arrêt des mouvements des leucocytes se produit avant l'apparition d'altérations morphologiques. D'une manière générale, les solutions qui produisent l'hémolyse détruisent aussi les globules blancs. D'après les expériences de Hamburger (*Osmotischer Druck*, I, 1902), les variations de la concentration moléculaire du milieu agissent sur le volume des leucocytes ; ils se gonflent dans les solutions hypotoniques et se ratatinent dans les solutions hypertoniques. Les acides en petite proportion produisent aussi leur gonflement *in vitro ;* l'acide carbonique fait de même. Il n'est pas certain que ce gonflement puisse se produire sans faire mourir la cellule. Cependant Hamburger admet que par suite de la présence de l'acide carbonique en excès, les leucocytes du sang veineux sont un peu plus gros que ceux du sang artériel.

Mais on ne doit pas compter absolument sur la vitalité des leucocytes d'un sang très dilué dans l'eau salée. Si l'on veut employer des milieux salés artificiels comme véhicule des substances à expérimenter sur les globules blancs, il faut ajouter très peu de liquide au sang. Les résultats sont différents lorsqu'au lieu du sang, on emploie la lymphe ; même en ajoutant très peu d'eau salée à celle-ci, les leucocytes sont rapidement altérés.

Lorsqu'on veut diluer le sang, tout en conservant intégralement la vitalité des leucocytes, il faut se servir du sérum du même animal, obtenu par une prise de sang antérieure ; les substances à expérimenter peuvent être diluées dans ce sérum. Chez les Batraciens, la lymphe péritonéale peut être employée de la même façon.

La plupart des liquides de l'organisme altèrent rapidement les leucocytes. *Ranvier* a montré depuis longtemps que les globules blancs de la grenouille ne peuvent vivre dans l'humeur aqueuse du même animal. Les leucocytes existent, au contraire, vivants et actifs, dans l'humeur aqueuse à la suite d'une ponction de la cornée ; mais il s'agit alors d'un liquide enflammé et modifié, d'un véritable exsudat.

Fig. 177. — Pus blennorrhagique. Mouvements amiboïdes d'un leucocyte observés à la température du laboratoire (23°). 375 diam.

L'urine, quand sa concentration est convenable et qu'elle est fraîche, n'empêche pas, le plus souvent, les mouvements actifs des leucocytes, comme on le voit très bien, chez l'homme dans l'urine contenant un léger exsudat purulent. Mais les leucocytes ne vivent pas longtemps dans ce milieu, et il faut, pour observer leurs mouvements, qu'il s'agisse de leucocytes diapédésés depuis peu.

Les mouvements amiboïdes peuvent être observés très facilement chez l'homme, dans le pus frais. Le pus de la blennorrhagie aiguë est un excellent objet. On dépose sur le plateau de la chambre humide une petite goutte d'eau salée à 9 p. 1.000 et on ajoute une goutte de pus frais ; la goutte de pus est aussi peu diluée que possible ; on recouvre d'une lamelle et on lute à la paraffine. Les mouvements des leucocytes sont très actifs ; presque tous sont mobiles, déjà à la température du laboratoire (1).

Les mouvements des leucocytes peuvent aussi être observés en dilacérant dans l'eau salée isotonique ou mieux dans le sérum sanguin

(1) Les mouvements amiboïdes des globules du pus ont été observés pour la première fois par Recklinghausen en 1863 (*Virchow's Archiv*, XXVIII) chez l'homme ; le pus était dilué avec de l'eau salée à 0,75 p. 100.

les tissus hémopoiétiques, la moelle osseuse en particulier. Mais ce sont là des objets peu favorables, parce que ces tissus contiennent de nombreuses cellules immatures et peu mobiles.

Mobilité des différentes variétés de leucocytes. — L'activité amiboïde est une propriété générale des leucocytes; mais tous ne la possèdent pas au même degré. Dans le sang de l'homme, les plus petits lymphocytes ont de simples mouvements pseudopodiques peu étendus ; les formes plus grosses ont des mouvements pseudopodiques plus accentués ; mais le plus souvent, ils ne s'accompagnent pas de reptation.

Fig. 178. — Rat. Épiploon. Leucocyte éosinophile, à noyau annulaire, fixé pendant ses mouvements. 1.500 diamètres.

Les leucocytes polynucléaires, reconnaissables à leur protoplasma très finement granuleux, ont des mouvements amiboïdes complets et rapides : ce sont les cellules les plus actives. Enfin les leucocytes à granulations éosinophiles, faciles à distinguer à cause de la grosseur et de la réfringence de leurs granulations, ont aussi des mouvements amiboïdes très actifs et sont capables de se déplacer.

Les leucocytes à noyau polymorphe sont les cellules les plus actives du sang. Chez l'homme, l'étude du pus de la blennorrhagie (composé presque uniquement de polynucléaires), l'étude du sang des leucocytoses aiguës, etc., montre encore avec évidence la grande mobilité de ces cellules.

Fig. 179. — Lapin. Suc exprimé de la section d'un ganglion lymphatique. Mouvements d'un gros lymphocyte observé à la température de 39 degrés. On voit le noyau dans plusieurs phases. 600 diam.

Les cellules à granulations éosinophiles sont peu nombreuses dans le sang normal de l'homme ; pour se convaincre de leur activité, on pourra étudier le sang des malades atteints de maladies donnant lieu à une augmentation considérable des leucocytes éosinophiles dans le sang (lèpre, dermatite de Duhring, etc.) (1). Le sang du cheval, à cause de la grosseur exceptionnelle des granulations des leucocytes granuleux, sera aussi un objet favorable (2).

(1) Jolly, *Société de Biologie*, 21 mai 1898.
(2) Jolly, *Archives d'An. micr.*, III, mars 1900.

La mobilité des lymphocytes a été plus discutée. *Max Schultze* n'avait pu voir aucune espèce de mouvements dans les plus petites de ces cellules. Les auteurs qui recherchèrent ensuite ces mouvements, surtout dans des cas de lymphocytémie, arrivèrent presque généralement à la conclusion que les lymphocytes étaient immobiles, d'où la théorie des leucocytoses mécaniques et passives, soutenue par *Ehrlich* pour la lymphocytose : les lymphocytes étaient déversés dans le sang par la lymphe du canal thoracique et n'y pénétraient pas par diapédèse (1).

Les lymphocytes sont pourtant parfaitement mobiles, comme on peut le constater par l'étude de nombreux objets : lymphe du canal thoracique, lymphe obtenue par la section d'un ganglion lymphatique frais, sang du rat et de la souris, sang de l'homme atteint de lymphocytose. Mais il faut, pour observer ces mouvements, porter la préparation à une température de 37-40°. Même à cette température, beaucoup restent immobiles ; ceux qui sont mobiles en présentent le plus souvent que des mouvements pseudopodiques sans reptation (2).

Fig. 180. — Lapin. Lymphe du canal thoracique. Mouvements d'un petit lymphocyte observés à la température de 34 à 36 degrés. On aperçoit le noyau dans une des phases. 700 diam.

Le sang des Batraciens urodèles où le noyau est bien visible pendant la vie de la cellule, la lymphe péritonéale de la grenouille fixée pendant les mouvements des leucocytes, permettent aussi de démontrer avec certitude les mouvements des lymphocytes (3).

Les lymphocytes sont donc doués de mobilité. On n'observe, à vrai dire, cette mobilité, le plus souvent, que sur un petit nombre d'entre eux, ce qui explique que, dans certains cas, elle puisse passer inaperçue. Ces mouvements sont peu considérables et peu étendus et nécessitent une température relativement élevée. Ils s'accompagnent quelquefois d'une reptation véritable. Ils permettent donc la diapédèse de ces cellules, que l'on peut quelquefois saisir sur le vif, sur des coupes de tissus fixés ; mais étant donné la différence d'activité, cette diapédèse est plus rare que celle des leucocytes à noyau polymorphe.

(1) Ehrlich et Lazarus, *Die Anæmia*, I, 1898, p. 70.

(2) Jolly, *Archives de méd. exp.*, 1898, et *S. de Biologie*, 8 janvier 1898 ; *S. de Biologie*, 7 juin 1902 ; *Archives de méd. exp.*, janvier 1903. Voir aussi Ranvier, *Traité technique* 1er éd. 1875, p. 693. Weidenreich ; *Archiv. f. mikr. Anatomie*, LXXIII, 1909.

(3) Jolly, *Arch. de méd. exp.*, 1898. — Meves, *Arch. f. mikr. anatomie*, LXXV, 1910. — Askanazy, *Centrablatt f. allg. Pathologie*, XVI, 1905.

On peut se demander quelle est la raison qui fait qu'un si grand nombre de lymphocytes sont privés de mouvements, alors que d'autres sont parfaitement actifs. Comme ces différences se voient sur des cellules situées les unes à côté des autres, dans le même milieu, examinées à la même température, et ayant souvent même aspect et mêmes dimensions, on pourrait supposer qu'il s'agit là d'éléments d'âge différent. Mais la question est difficile à résoudre pour les lymphocytes, parce que les types cellulaires correspondant à des degrés différents d'évolution sont très difficiles à reconnaître, surtout sur des cellules vivantes. Mais dans la moelle osseuse rouge, les cellules jeunes, immatures, sont assez faciles à distinguer, parce qu'elles sont souvent plus grosses et que leur noyau présente des caractères particuliers. De plus, dans une forme particulière de leucémie, ces cellules immatures, ces myélocytes se trouvent dans le sang en quantité considérable. Le sang des malades atteints de myélocytémie est donc un objet très favorable pour l'étude des mouvements des myélocytes. Or, ces myélocytes ont des mouvements protoplasmiques actifs, mais ces mouvements sont beaucoup plus lents et moins étendus que ceux des leucocytes à noyau polymorphe. Les formes immatures, les formes mères sont donc des cellules beaucoup moins mobiles que les formes complètement évoluées (1).

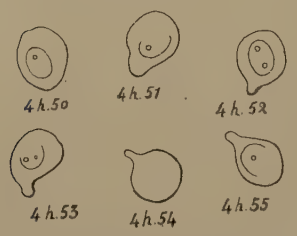


Fig. 181. — Myélocytémie. Sang du doigt. Mouvements d'un myélocyte observés à 38°. Dans plusieurs phases, on aperçoit distinctement le noyau ovalaire avec ses nucléoles.

La propriété amiboïde est donc une propriété générale, mais les différents types de leucocytes ne la possèdent pas au même degré. Les formes mères qui existent dans les tissus hémopoiétiques sont des cellules moins mobiles que les leucocytes auxquels elles donnent naissance. Ces constatations éclairent, comme nous le verrons, le mécanisme de la leucocytose. Si les leucocytes polynucléaires sont ceux qui affluent le plus souvent dans le sang, c'est ce que cette variété cellulaire représente la forme mûre du tissu médullaire, la plus nombreuse et aussi la plus mobile.

Les cellules qui résultent de la division d'un myéloblaste et qui se transforment en leucocytes, acquièrent ainsi progressivement leur

(1) Jolly, *S. de Biologie*, 8 janvier 1898 et 7 décembre 1901 ; *Archives d'An. micr.*, III, 1900 ; *Archives de méd. exp.*, 1898 et 1902.

mobilité, comme la spermatide lorsqu'elle se transforme en spermatozoïde.

La mobilité des mastzelles du sang est peu connue. On peut l'admettre, d'après l'observation de la diapédèse de ces cellules sur les tissus fixés. Quand on cherche à l'observer directement, dans le sang des Batraciens où ces cellules sont reconnaissables, on constate qu'elle est très faible ; il en est de même pour les cellules analogues du tissu conjonctif (voir ch. VI).

Leucocytes immobilisés « in vitro » dans leur forme amiboïde. — Si on observe, à la température du laboratoire, dans une chambre humide, de la lymphe péritonéale de grenouille, on peut voir, à côté de leucocytes présentant des mouvements actifs, d'autres leucocytes qui, après avoir poussé des pseudopodes, ont des mouvements extrêmement lents et paraissent même s'immobiliser dans leur forme amiboïde. Ces leucocytes à déformations extrêmement lentes sont plus nombreux dans une préparation qui a été abandonnée pendant vingt-quatre heures (1). Ces cellules présentent parfois des prolongements considérables ; leur noyau est ovalaire ou réniforme. Nous examinerons plus loin (ch. VI) les relations qui existent entre ces cellules et les cellules conjonctives.

Fixation des leucocytes pendant leurs mouvements. — L'observation directe des leucocytes vivants doit être complétée par l'étude des leucocytes fixés pendant leurs mouvements. On peut réaliser cette fixation dans la lymphe, ou dans le sang, en faisant passer le réactif fixateur (solution saturée d'acide picrique, mélange chromo-osmique, etc.) sous la lamelle. La lymphe péritonéale des Batraciens est un objet particulièrement favorable. La goutte de lymphe est examinée dans une chambre humide extemporanée ; la lamelle repose sur deux supports de paraffine (voir ch. I) ; la préparation est lutée à la paraffine. Lorsque les leucocytes sont en mouvement, on enlève la paraffine avec la pointe d'un scalpel, sur les bords droit et gauche ; on fait passer le réactif fixateur. Lorsque la fixation est amorcée, on enlève la paraffine avec soin, sans déplacer la lamelle, et on plonge la préparation entière dans une soucoupe remplie du même réactif ; la lamelle se soulève, et la fixation est achevée en quelques minutes. La préparation et lavée, colorée et montée par les méthodes usuelles. On peut aussi exposer la goutte de lymphe aux vapeurs d'acide osmique. Cette manière de faire peut être utilisée aussi pour le sang (2).

Cette technique est applicable à la lymphe, aux sérosités et au sang de l'homme et des animaux à sang chaud. Dans ce cas on laisse la préparation quelques instants dans l'étuve à 37°, avant de la fixer, afin d'avoir des leucocytes bien actifs.

(1) Ranvier, *C. R. Acad., des sc.*, 6 avril 1891. — Jolly, *Arch. de méd. exp.*, 1898.

(2) Voir Jolly, *Archives de méd. exp.*, 1898. — Meves, *Archiv f. mikr. Anatomie*, LXVIII, 1906, et LXXV, 1910.

Durée de la vie des leucocytes « in vitro ». — Les mouvements amiboïdes, expression directe et signe certain de la vie de la cellule, permettent de déterminer la durée de la survie des leucocytes en dehors de l'organisme. Ces expériences peuvent être faites avec le sang des Mammifères comme avec le sang des Batraciens. Si on abandonne à la température du laboratoire une préparation de sang frais de l'homme, on peut, si la préparation a été faite à l'abri des impuretés, observer les mouvements amiboïdes pendant plusieurs jours et jusqu'à huit jours même, en réchauffant chaque fois la préparation à 37°.

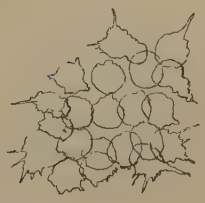


Fig. 182. — Sang de grenouille conservé en tube scellé du 28 juillet 1910 au 25 juillet 1911. Groupe de leucocytes montrant presque tous des mouvements pseudopodiques, à 25°. Survie de un an.

Mais le sang des Batraciens est un objet beaucoup plus favorable avec lequel on peut obtenir des survies considérables. Lorsqu'on conserve le sang à la température du laboratoire (12-18°) on peut observer les mouvements des leucocytes pendant 8, 15, 30 jours (1). Mais en conservant le sang à une basse température, on obtient des survies infiniment plus longues, dépassant une année.

Voici comment il faut faire ces expériences : le sang d'une grenouille est aspiré dans le cœur à l'aide d'une pipette stérilisée. Lorsque la partie effilée, qui ne doit pas être trop mince, est remplie d'une petite colonne de sang, de 2 centimètres de hauteur par exemple, on la sépare à la flamme et on la scelle sans addition d'aucun liquide ni d'aucun réactif. On remplit ainsi un certain nombre de tubes ou de fines ampoules. Si le sang n'a pas subi le contact des tissus, la coagulation, le plus souvent, ne se produit pas. Il est juste de dire que même avec des tubes où le sang s'est coagulé, on peut faire de bonnes observations, parce que de nombreux leucocytes vivants s'échappent du caillot et qu'on les observe dans le sérum. Ces tubes scellés sont conservés à la glacière. Après différents intervalles de temps, ils sont ouverts et le sang est examiné entre lame et lamelle à la température du laboratoire. Dans ces conditions, on peut suivre les mouvements des leucocytes vivants dans du sang conservé *in vitro* depuis plusieurs mois (2). D'une manière générale, dans ces expériences,

Fig. 183. — Sang de grenouille conservé *in vitro* du 27 juillet 1910 au 12 février 1912. Mouvements amiboïdes d'un leucocyte observés à 23° le 14 février 1912. Survie de 18 mois et demi.

(1) Ranvier, *Traité technique*. — Jolly, *S. de Biologie*, 7 novembre 1903.

(2) Jolly, *S. de Biologie*, 9 juillet et 22 octobre 1910, 22 juillet 1911 et 26 avril 1913. La survie peut être observée jusqu'à dix-huit mois, ce qui semble une limite dans le conditions de ces expériences.

les globules rouges meurent avant les leucocytes, qui les incorporent ; on trouve, dans ces préparations, des leucocytes énormes, gorgés de grains réfringents plus ou moins colorés, qui sont des fragments d'hématies.

Dans ces expériences, les leucocytes ne semblent pas se diviser. Il est probable que les cellules qu'on observe après plusieurs mois sont des cellules qui existaient telles au moment où le sang a été placé *in vitro*. Il n'est pas nécessaire de réchauffer le sang pour observer les mouvements de leucocytes ; le temps d'ouvrir le tube et de faire la préparation à la température du laboratoire suffit. Il s'écoule donc à peine quelques minutes entre la sortie de la glacière et l'observation des mouvements. Cette constatation permet de penser que la limite inférieure de la température à laquelle peut se manifester l'activité des leucocytes est très basse et c'est ce qu'on peut constater, en effet, par l'observation directe (voir plus haut) (1).

Mort des leucocytes. Altérations du noyau et du cytoplasme. — Les préparations de lymphe et de sang frais présentent toujours, au bout d'un temps variable, des cellules lymphatiques qui sont mortes; ces leucocytes morts se reconnaissent facilement à l'aspect de leur noyau qui est devenu très apparent et réfringent. Le noyau de la cellule morte apparaît unique et sphérique ou bien il est formé de plusieurs petits noyaux régulièrement arrondis. Dans ces noyaux, on ne distingue plus de réseau de chromatine; après fixation et coloration *in vitro*, ils se colorent d'une façon diffuse par les colorants nucléaires. Le centre de certains noyaux est vacuolisé ; la portion chromatique qui entoure la vacuole a une forme annulaire ou en croissant. D'autres cellules ne contiennent plus qu'un nombre variable de petits globules sphériques et réfringents prenant énergiquement les colorants nucléaires (2).

Ainsi, le noyau perd sa structure, le réseau chromatique disparaît, la chromatine semble se dissoudre dans le suc nucléaire ; le noyau se colore d'une façon homogène. En même temps, sa consistance change et semble devenir plus fluide. Puis il se résout en une seule masse sphérique (pycnose) ; ou bien le noyau se fragmente directement en un nombre variable de grains sphériques inégaux prenant très vivement et d'une façon homogène les matières colorantes nucléaires (3); ou bien encore le noyau se vacuolise et se fragmente ensuite. Les granules chromatiques peuvent se libérer du protoplasma. Ces phénomènes sont vraisemblablement des phénomènes de simple cadavéri-

(1) Cette résistance remarquable des leucocytes est contraire à l'idée de la destruction de ces cellules dans l'acte de la coagulation (voir ch. VIII).

(2) Jolly, *Archives de méd. exp.*, 1898.

(3) Le noyau pycnotique prend d'abord vivement les couleurs basiques, puis brusquement l'affinité de la chromatine change et il ne prend plus que les couleurs acides. Nous étudierons ces faits à propos de la disparition du noyau des globules rouges.

sation qui suivent la mort du noyau, plutôt que des phénomènes de dégénérescence proprement dite (1).

Pendant que se produisent ces altérations du côté du noyau, le protoplasma se modifie également. Des vacuoles y apparaissent d'abord. Puis le corps du leucocyte se gonfle, devient parfaitement sphérique et transparent; le protoplasme se liquéfie et semble contenu dans une vésicule limitée par une membrane très mince. Dans le liquide de cette vésicule se trouvent souvent suspendus un grand nombre de petits granules animés de vifs mouvements browniens (2).

Fig. 184. — Axolotl. Lymphe péritonéale conservée en chambre humide pendant quelques jours, puis fixée et colorée. Leucocytes montrant différents aspects de la pycnose du noyau. 375 diam.

Ces altérations se rencontrent dans tous les exsudats inflammatoires. Dans le sang conservé *in vitro*, les leucocytes finissent aussi par les montrer. Il en est tout autrement dans le sang circulant. Dans le sang frais de l'homme, les figures de pycnose des leucocytes n'existent guère que chez les malades atteints de leucémie et elles y sont toujours extrêmement rares. Dans le sang normal de l'homme et des Mammifères qui a été fixé et coloré aussitôt recueilli, on ne trouve jamais ces altérations nucléaires; ces figures sont absolument exceptionnelles. Cette constatation négative semble montrer que chez les Vertébrés supérieurs, tout au moins, les leucocytes meurent ailleurs que dans le sang de la circulation générale (3).

Le plus grand nombre des altérations des leucocytes qui ont été décrites dans le sang de l'homme sont des altérations artificielles dues

(1) Ces modifications qui indiquent la mort du noyau et par suite celle de la cellule ont été décrites pour la première fois par Flemming sous le nom de *chromatolyse*. Plus tard, le nom de *pycnose* (condensation) a été appliqué au même phénomène, et c'est cette dénomination qui est aujourd'hui la plus usitée. En réalité, ces deux termes s'appliquent exactement à deux phases successives : 1° destruction de la charpente nucléinienne avec dissolution de la chromatine dans le plasma nucléaire ; 2° condensation du noyau en une petite sphère homogène qui peut se fragmenter. Le terme de chromatolyse a été employé ensuite pour désigner la disparition des portions colorables du protoplasma des cellules nerveuses. La *dislocation* (caryorrhexis) de la charpente nucléaire précède quelquefois la dissolution de la chromatine ; il s'agit là, en réalité, des variétés d'aspect d'un même phénomène.

(2) Les mouvements browniens véritables ne sont généralisés que dans des leucocytes morts comme on l'observe dans les corpuscules salivaires (voir ch. vi) ; mais ils peuvent apparaître dans des leucocytes encore vivants et mobiles, au centre de vacuoles. Ces phénomènes sont naturellement différents du lent écoulement des granulations entraînées dans les pseudopodes. Voir Duvernay, *C. R. Ass. des an.*, VI, Toulouse, 1904.

(3) J. Jolly, *S. de Biologie*, 8 novembre 1902 et *Archives de méd. exp.*, janvier 1902.

surtout à la dessiccation. Si on fixe le sang frais sans dessiccation, on ne les trouve pas (1).

Les altérations des leucocytes que l'on observe dans le sang du cadavre (2), dans le sang épanché dans les tissus, dans les anciens exsudats, etc., sont du même ordre que celles qu'on observe *in vitro*.

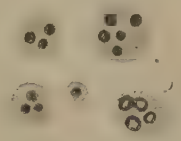


Fig. 185. — Pus blennorrhagique fixé et coloré. Leucocytes polynucléaires dont le noyau est nécrosé. 700 diam.

La résistance des granulations leucocytaires est en général assez grande (3). Au cours de l'autolyse cadavérique, les réactions colorantes de ces granulations peuvent se modifier et les grains peuvent prendre en partie la couleur nucléaire (4).

Dans les leucocytes du sang ou de la lymphe conservés *in vitro*, il n'est pas rare de voir se former, au niveau de leucocytes en apparence intacts, des bourgeons protoplasmiques arrondis qui tendent à se détacher. Ce phénomène, connu depuis très longtemps, a été souvent considéré comme l'origine des globulins. On l'observe surtout au niveau des mononucléaires et des plus gros lymphocytes. Il correspond probablement à une altération et précède les modifications du noyau et du cytoplasme que nous avons décrites.

Fig. 186 — Sang d'homme : myélocytémie. Débris nucléaires libres et leucocyte à noyau en chromatolyse. 735 diam.

La condensation du noyau des polynucléaires en une seule masse, au cours de la pycnose, peut donner lieu à la formation de pseudo-lymphocytes granuleux et de pseudo-myélocytes granuleux qui, dans les exsudats, peuvent parfois prêter à confusion. En général cependant, le noyau polymorphe dégénéré se résout directement en plusieurs sphérules (5).

(1) Dans le sang des Batraciens on peut trouver des leucocytes à noyau polymorphe, dont un segment nucléaire terminal est un pycnose. Chez l'homme et chez les Mammifères, au cours de diverses intoxications (essences, benzol, ypérite, etc.) on peut trouver dans le sang des leucocytes altérés avec pycnose du noyau ; mais ils sont toujours rares (voir ch. VII).

(2) Sabrazès, Muratet, Lande, *Actes de la Soc. linnenne de Bordeaux*, LXVII, 1913.

(3) A part les granulations des mastzelles. Cette variété de leucocytes dans le sang de l'homme, a été considérée comme représentant déjà une altération. Dans les exsudats on peut observer parfois une nécrose massive des leucocytes, le noyau paraissant complètement dissous dans un protoplasma homogène.

(4) Quand on injecte dans la cavité péritonéale d'un animal, dans un but expérimental, des substances en suspension ou en solution dans l'eau salée isotonique ou même dans le sérum, ou dans du bouillon, on produit naturellement des altérations des cellules libres, surtout lorsque la quantité injectée est assez grande.

(5) Le noyau normal des lymphocytes présente souvent une profonde incisure. Dans certaines formes de leucémie, Riedera décrit des lymphocytes dont le noyau est fragmenté en grosses masses. Voir Ehrlich et Lazarus, *l. c.*, et Weidenreich, *Die Leukocyten*, l. c.,

Dans les exsudats, les leucocytes altérés sont en général phagocytés par les cellules conjonctives et endothéliales. Il en est de même dans les organes hémopoiétiques, qui à l'état normal sont le principal siège de leur destruction. Des leucocytes peuvent être phagocytés intacts en apparence; dans l'intérieur du phagocyte, ils subissent secondairement des altérations analogues à celles que nous avons décrites et dont les plus visibles sont la condensation et la fragmentation du noyau.

Dans les leucocytes des exsudats, on peut voir apparaître du glycogène et des granulations graisseuses colorables par l'acide osmique (1)

Les altérations morphologiques des leucocytes ont été quelquefois prises comme témoins pour juger de la résistance plus ou moins grande de ces cellules dans diverses circonstances pathologiques. Mais jusqu'ici, nous ne connaissons guère de moyen certain de juger de ces variations de résistance (2).

Granulations graisseuses. Granulations lipoïdes. — Dans le sang conservé *in vitro*, les colorations vitales permettent de voir apparaître dans le cytoplasme des leucocytes, des granulations graisseuses et des granulations lipoïdes.

On dépose sur la lame une petite goutte d'une solution alcoolique concentrée de bleu crésyl brillant; on laisse sécher, on ajoute la goutte de sang, et on lute à la paraffine. Si l'on fait l'observation à une température suffisante (25-37°), on peut suivre les mouvements des leucocytes polynucléaires pendant que leurs granulations se colorent en violet. Le noyau apparaît vert très pâle. Lorsque la cellule meurt et devient immobile, il se colore en violet foncé. Dans le corps protoplasmique encore vivant et mobile, on voit apparaître progressivement des granulations rouge pourpre qui peuvent confluer. Lorsque la cellule a subi des phénomènes d'autolyse, elles sont agitées, comme les granulations neutrophiles, d'un mouvement brownien dans les vacuoles. Ces granulations sont solubles dans l'éther, l'alcool absolu, le benzol, l'acétone, le xylol, etc. Elles ne sont pas fixées par le formol et les solutions osmiques. Elles ne noircissent pas par l'acide osmique. Elles sont insolubles dans les solutions de bichromate à 2,5-5 p. 100 et dans le sublimé saturé. Elles ne sont pas colorées par le scharlach et le soudan. On peut ajouter au bleu crésyl du soudan dans la solution alcoolique et obtenir, en coloration vitale, dans la même cellule, les globules de graisse colorés en rouge orangé et les granulations lipoïdes colorées en rouge pourpre (3). Les gouttelettes

(1) Voir chap. VI et LOEPER, *Archives de méd. exp.*, XIV, 1902.

(2) Les méthodes d'évaluation de la résistance des leucocytes qui ont été recommandées récemment reposent sur un principe incertain. Voir MOUREAU, Th. Bordeaux, 1919, et MAURIAC et MOUREAU, *J. méd. franç.*, juin 1920.

(3) CESARIS DEMEL, *Virchow's Archiv*, CLXXXXV, 1909. — HAMMAR, *Kungl. Svenska Vetenskapsakad. Handlingar*, XLIX, n° 3, 1912. Voir aussi LEVADITI, *J. de phys. et de pathol. gén.*, 1901, et *Virchow's Archiv*, CLXXX, 1905. Le bleu crésyl brillant peut être remplacé par le bleu de Nil. FIESSINGER recommande la solution suivante : Soudan III, 0 gr. 06; bleu de Nil, 0 gr. 03; alcool absolu, 20 cc. (*J. méd. français*, juin 1920). Les granulations

de graisse se colorent en noir par l'acide osmique et le bleu crésyl ne les teint pas ; elles sont donc faciles à distinguer.

Les granulations graisseuses existent déjà, en petit nombre, dans certains leucocytes polynucléaires du sang circulant. Les granulations lipoïdes y sont au contraire rares et apparaissent surtout *in vitro*. Dans les lymphocytes et les mononucléaires, elles semblent préexister dans les leucocytes du sang circulant. Comme elles se colorent en pourpre par l'azur II, certains auteurs ont voulu les identifier aux granulations azurophiles ; on les a aussi identifiées aux corps de Kurloff ; mais ces relations ne sont pas encore nettement connues. Nous ne connaissons pas non plus leurs rapports avec les mitochondries (1). Elles existent aussi dans les mastzelles et les leucocytes éosinophiles.

Hammar a considéré ces granulations lipoïdes comme dues à l'action d'un ferment intra-leucocytaire. Il s'agirait d'un phénomène d'autolyse précédant la mort de la cellule (2). Les granulations lipoïdes et les granulations graisseuses intra-leucocytaires apparaissent en plus grand nombre dans le sang circulant au cours des intoxications expérimentales (phosphore, arsenic, etc.).

Fig. 187. — Attraction des leucocytes par l'oxygène. Goutte de sang de triton conservée en chambre humide. Bord de la goutte, en partie coagulée, examiné après 48 heures. Accumulation des leucocytes dans la bordure de plasma.

Attraction des leucocytes. Chimiotaxie. — Le déplacement total et la progression du leucocyte sont causés par la répétition du mouvement pseudopodique dans le même sens. On peut supposer qu'une cause d'excitation connue du mouvement protoplasmique n'agisse que sur un côté seulement de la cellule. A cette excitation unilatérale répondra un mouvement unilatéral, c'est-à-dire qu'il se formera un pseudopode de ce côté. Si la source d'excitation persiste, le mouvement pseudopodique, se faisant toujours dans le même sens, forcera nécessairement les parties opposées du corps cellulaire à suivre le mouvement en se contractant ; ainsi, le leucocyte avancera, dans une

lipoïdes se colorent par le bleu de Nil et par le rouge neutre. Pour la recherche de la graisse dans les coupes, on emploie des coupes faites par congélation de tissus fixés dans une solution de bichromate-formol sans acide ; les coupes sont colorées avec une solution de soudan III dans l'alcool à 85° et montées dans la glycérine. On peut colorer d'abord les noyaux avec l'hématoxyline.

(1) Il est très possible qu'elles représentent des mitochondries altérées ou confluentes. Fiessinger a observé, dans certains cas, la raréfaction des granulations leucocytaires coïncidant avec l'apparition de gouttelettes lipoïdes dans la même cellule ; ces dernières seraient, pour lui, formées de granulations agglutinées.

(2) D'après Fiessinger et Clogne (*C. R. Ac. des sc.*, 19 novembre 1917), les enclaves

direction déterminée, et vers la source d'excitation. Telle est l'explication la plus simple qu'on puisse donner du tactisme. Il est vrai que le mécanisme véritable de ces phénomènes est peut-être beaucoup plus compliqué.

Le premier fait acquis sur le tactisme des leucocytes est l'attraction qu'exerce sur eux l'oxygène. On fait une préparation de lymphe de grenouille en chambre humide ; on s'assure que les leucocytes sont répartis à peu près uniformément ; le lendemain, on observe que la plupart de ces cellules se trouvent à la périphérie, au voisinage de la rigole circulaire, et par conséquent, de la réserve d'air (1).

C'est bien là un fait de chimiotaxie. Plus tard, *Leber* (2), injectant dans la chambre antérieure de l'œil de lapin des cultures filtrées de microbes pyogènes, y vit affluer les leucocytes, qu'il retrouvait en examinant l'humeur aqueuse au bout d'un temps déterminé et qu'il supposait attirés par des produits injectés. Depuis, les expériences de chimiotaxie ont été faites avec un grand nombre de substances et ont été réalisées *in vivo* en introduisant sous la peau d'un animal de minces tubes de verre, effilés à la lampe et divisés en courts segments de 10 à 15 mm. de longueur et de 0,1 à 0,3 mm. de diamètre, remplis de la substance à expérimenter (3). On les retire à des intervalles déterminés et on examine leur contenu. Suivant qu'ils contiennent peu ou beaucoup de leucocytes, on conclura que la substance attire faiblement ou énergiquement les leucocytes. Dans certains cas, plus rares, le tube ne contient aucun leucocyte. On a pensé alors que la substance introduite, loin d'attirer les leucocytes, les repoussait et on a distingué une chimiotaxie négative opposée à la chimiotaxie positive. Mais il est probable que dans la plupart de ces cas il n'y a pas de répulsion et que ces faits correspondent simplement à une absence d'attraction (4).

lipoïdes du leucocyte peuvent être transformées par l'effet d'un ferment (lipoïdase) qui dissocie la lécithine en libérant la choline.

(1) « Il est facile de reconnaître d'abord que les prolongements les plus volumineux et les plus nombreux se produisent sur la partie de la cellule tournée du côté de l'air. En suivant pas à pas les transformations des prolongements d'une de ces cellules, on les voit s'allonger, grossir et absorber peu à peu la substance du corps de la cellule de telle sorte que finalement, celui-ci est déplacé. » Ranvier, *Traité technique*, 1re éd., 1875, p. 163.

(2) Leber, *Forschritte der Medicin*, VI, 1888, et *Die Entstehung der Entzundung*, Leipsig, 1891.

(3) Massart et Bordet, *Soc. royale des sciences méd. et naturelles de Bruxelles*, 3 février 1890 et *Annales Pasteur*, 1891. — Metschnikoff, *Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation*, Paris, 1892. — Buchner, *Berliner klin. Woch.*, 1890. — Massart, *Annales Pasteur*, 1892. — Gabritchevsky, *Annales Pasteur*, 1890.

(4) Les faits de chimiotaxie négative véritable sont assez rares. Voir les observations de Policard et Leriche sur l'action de la lumière (*Soc. de Biologie*, 22 décembre 1917. Les

L'attraction chimiotactique des leucocytes a été montrée pour un grand nombre de substances (toxines microbiennes, substances albuminoïdes, etc.). Toutefois, les expériences *in vitro* concernant l'observation directe du mouvement du leucocyte sont encore peu nombreuses (1).

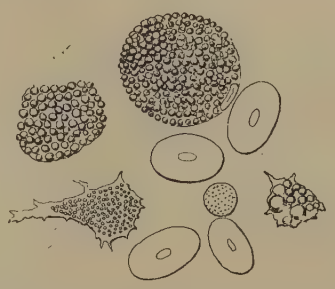


Fig. 188. — Lymphe de grenouille examinée sans réactifs. Phagocytose de globules de lait par les leucocytes.

Absorption des corps étrangers. Phagocytose. — Par suite de la mobilité de leur protoplasma nu, les leucocytes sont capables d'incorporer les matières pulvérulentes. Ce phénomène, observé pour la première fois en 1862 chez les Invertébrés par *Haeckel*, et chez les Batraciens par *Recklinghausen*, fut démontré en 1865 chez les Mammifères par les expériences fondamentales de *Max Schultze* (2). Plus tard, *Metchnikoff* (3) montra que ce phénomène pouvait s'appliquer à des microbes vivants.

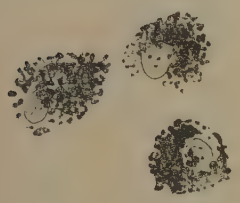


Fig. 189. — Triton crêté. Lymphe péritonéale. Cellules lymphatiques qui ont phagocyté *in vitro* des grains de vermillon et ont été ensuite fixées. 300 diam.

Manière d'observer la phagocytose. — Pour observer l'absorption des corps étrangers par les leucocytes, on se sert de préférence de poudres inertes colorées, carmin, vermillon, bleu d'aniline insoluble dans l'eau, encre de Chine, etc. Le vermillon (cinabre ou sulfure rouge de mercure pulvérisé) convient très bien. L'expérience peut se faire *in vivo* ou *in vitro*. Pour réaliser l'expérience *in vivo*, on fait dans un petit mortier une suspension de vermillon dans l'eau salée à 8 p. 1.000. Au moyen d'une seringue de verre, on injecte 1 ou 2 gouttes de cette suspension dans le sac lymphatique dorsal, ou mieux, dans la

tubes de verre contenant les substances expérimentées peuvent être introduits dans le sac lymphatique dorsal de la grenouille. Ils peuvent être remplacés par deux lamelles accolées, soudées avec de la paraffine et limitant un étroit espace. On les introduit sous la peau ou dans la cavité péritonéale. On peut se servir aussi de substances poreuses ; l'expérience peut être variée de bien des façons. Les leucocytes peuvent être attirés par des substances et par des microorganismes qui leur sont nuisibles. Voir Werigo, *Archives de méd. exp.*, XIII, 1901.

(1) Sicherer, *Münchener med. Woch.*, XLIII, 1896. — Comandon, *Soc. de Biologie*, 17 mars 1917. L'attraction chimiotactique est un phénomène général qui a d'abord été observé sur les masses protoplasmiques nues des myxomycètes par Stahl. Voir les travaux d'Engelmann sur les infusoires et les observations de Pfeffer sur les anthérozoïdes des fougères, in Verworn, *Physiologie générale*, trad. fr. de Hédon. Paris, 1900.

(2) Max Schultze, *Arch. f. mikr. anatomie*, I, 1865. Recklinghausen, *Virchow's Archiv*, XXVI, 1863.

(3) Metchnikoff, *Virchow's Archiv*, 1884, et *Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation*, Paris, 1892.

cavité abdominale d'une grenouille. Dans ce dernier cas, pour éviter de blesser l'intestin, on fait avec les doigts un pli comprenant la paroi musculaire avec la peau du ventre; on embroche la base du pli avec l'aiguille et on attire ensuite l'aiguille vers soi en lâchant le pli; la pointe de l'aiguille se trouve alors libre dans la cavité abdominale et on peut pousser l'injection sans crainte de blesser le tube digestif. Il faut injecter une très petite quantité; si l'on diluait trop la lymphe, la préparation contiendrait après vingt-quatre heures un trop grand nombre de leucocytes altérés.

A moins de recherches spéciales, destinées, par exemple, à évaluer la rapidité de l'incorporation, on attend jusqu'au lendemain. On recueille la lymphe et on l'examine *in vitro*. On observe alors qu'un grand nombre de cellules lymphatiques contiennent des grains de vermillon qui apparaissent avec leur forme cristalline et leur coloration rouge foncé. En suivant les mouvements des cellules qui portent les grains, on se convainc facilement que les grains sont dans l'intérieur du leucocyte et qu'ils sont entraînés par le mouvement protoplasmique au centre des pseudopodes, dont ils suivent l'extension et la rétraction.

L'incorporation peut aussi se faire *in vitro*. Dans ce cas, on ne doit pas mélanger la lymphe avec la suspension salée : on fait la suspension dans l'eau distillée, on dépose sur le plateau de la chambre humide une simple trace de cette suspension; on laisse évaporer et on ajoute ensuite la goutte de lymphe. Les grains de vermillon se trouvent bientôt suspendus dans la lymphe et les cellules lymphatiques les incorporent. Cet englobement se fait assez vite, mais il se poursuit pendant des heures et même des jours, si bien que les globules blancs finissent par être absolument bourrés de grains et deviennent tout noirs. Si on veut activer la phagocytose, on peut placer la préparation dans une étuve à 25°.

On peut utiliser, pour ces expériences, beaucoup d'autres substances. Le carmin s'emploie comme le vermillon; il donne des grains un peu moins fins. Le bleu d'aniline est préparé de la façon suivante. Dans un tube à essai rempli au tiers d'alcool, on ajoute du bleu d'aniline en poudre (soluble dans l'alcool, insoluble dans l'eau). On chauffe au bain-marie, et lorsque le bleu est complètement dissous, on filtre à chaud en recevant la liqueur colorée dans une quantité d'eau distillée qui, en volume, doit être plus du double de celle de l'alcool. Le bleu forme alors un précipité d'une finesse extrême qui reste en suspension dans la liqueur. Cette suspension est utilisée comme les suspensions de vermillon.

Enfin on peut se servir de lait, de grains d'amidon, d'encre de Chine, de noir de fumée, de globules rouges, etc. Les grains d'amidon sont très favorables, parce que leur forme polyédrique et leur réfringence permettent de les distinguer facilement. On peut, du reste, associer plusieurs de ces substances. On peut aussi varier l'objet d'étude et injecter les corps étrangers dans l'œil de la grenouille, dans la cavité péritonéale d'un triton, ou dans celle d'un rat ou d'un cobaye, etc. Les préparations de lymphe péritonéale contenant les phagocytes peuvent être fixées et colorées par les méthodes que nous avons indiquées plus haut pour la fixation des leucocytes dans leurs mouvements.

Le phénomène peut être mis en évidence dans le sang, en mélangeant la goutte de sang directement à une trace de vermillon pulvérisé et en examinant la préparation ainsi faite, après l'avoir recouverte d'une lamelle et fermée à la paraffine. S'il s'agit du sang d'un batracien, on active le phénomène en portant quelques

instants la préparation à 25°. Avec le sang d'un mammifère on observe à 37° à l'aide d'une platine chauffante (1).

Dans ces diverses expériences, on constate que les leucocytes qui ont absorbé des corps étrangers au point d'en être complètement bourrés, présentent en général des mouvements amiboïdes moins vifs; les mouvements pseudopodiques sont conservés, mais le mouvement de reptation est moins rapide ou n'existe pas. Il est toutefois certain que la phagocytose, au début, n'empêche ni la diapédèse ni la migration (voir ch. VII).

Influence du milieu et des diverses substances sur la phagocytose. — La phagocytose est gênée ou favorisée par les diverses influences qui agissent sur les mouvements amiboïdes. Elle est très sensible aux modifications de la concentration moléculaire du milieu (2). Elle se fait bien surtout dans les milieux naturels (lymphe, sang, sérosités, sérum, etc.). Elle est peu modifiée si l'on dilue ces milieux avec une solution de chlorure de sodium isotonique, surtout si la dilution est faible. Elle est troublée ou arrêtée par les modifications de la concentration moléculaire du sang produites en ajoutant de l'eau distillée ou du chlorure de sodium.

Si la modification de concentration n'a pas été trop forte et n'a pas tué les cellules, le retour à la concentration normale permet à la phagocytose de s'effectuer de nouveau. La qualité chimique des solutions, la nature des ions qui interviennent a, comme la concentration moléculaire, son influence. L'addition de $CaCl^2$ en petite quantité à la solution salée paraît avoir une influence favorable. Mais, les solutions de NaCl pures, isotoniques, permettent au phénomène de s'effectuer, au moins pendant quelque temps (3).

La diminution de l'alcalinité du sérum est très défavorable. Les moindres traces d'acide tuent les leucocytes. Au contraire, on peut augmenter, dans certaines limites, la teneur du sérum en alcali sans modifier notablement le pouvoir phagocytaire.

L'action des anesthésiques et de divers toxiques, comme la quinine, la morphine, les sérums hétérogènes, etc., a été aussi étudiée sur la phagocytose que ces substances gênent en général (4). A vrai dire, cependant, la plupart des expériences ont été faites *in vivo*, où des facteurs multiples interviennent (5).

La phagocytose est une propriété générale des leucocytes, mais toutes les

(1) La phagocytose a été étudiée à l'aide de l'enregistrement cinématographique par Comandon, *S. de Biologie*, 15 novembre 1919.

(2) Hamburger et Hekma, *Archives néerlandaises des sciences exactes et naturelles*, XIII, 1907. Les expériences sont faites avec des leucocytes du sang de cheval obtenus par sédimentation de sang défibriné. Les globules rouges se déposent ; le sérum qui surnage forme une suspension de leucocytes, qu'on fait agir sur de fines particules de charbon (noir de fumée).

(3) D'après les expériences de Hamburger et Hekma, les leucocytes peuvent supporter, une addition d'eau assez grande au sérum et au sang sans perdre leur pouvoir phagocytaire ; celui-ci subsiste alors que l'hémolyse est déjà commencée. Ces résultats viennent à l'appui de ce que nous avons dit plus haut sur la résistance des leucocytes.

(4) Cantacuzène, *Annales Pasteur*, 1898. — Tarassevitch, *Propriétés phagocytaires des leucocytes*, in Gilbert et Weinberg, *Traité du sang*, I, p. 279.

(5) *In vitro*, la quinine, à dose suffisante (chlorhydrate et formiate à 1 p. 1.000) tue les leucocytes et empêche la phagocytose. Avec les narcotiques, avec la morphine par exemple, il faut en général des doses plus fortes. D'après Hamburger, les narcotiques, à petites doses, seraient capables d'agir comme excitants.

variétés de leucocytes ne la possèdent pas au même degré; elle dépend de l'abondance du protoplasma et aussi du degré d'amiboïsme de la cellule. Les lymphocytes ont un pouvoir de phagocytose assez faible; ce sont les polynucléaires qui, ici encore, comme au point de vue de la mobilité, sont les plus actifs. Quant aux leucocytes éosinophiles, ils possèdent le pouvoir phagocytaire(1); mais chez l'homme et les mammifères tout au moins, ce pouvoir est moindre que celui des polynucléaires.

Mécanisme de la phagocytose. — Contrairement aux descriptions souvent données de ce phénomène, on ne voit que bien rarement le leucocyte pousser un pseudopode spécial destiné à aller saisir le corps étranger situé au voisinage. S'il arrive que l'extrémité d'un long pseudopode incorpore un fin granule, c'est là une circonstance fortuite et le phénomène se produit presque toujours autrement. Pendant la reptation, les grains qui se trouvent au contact de la masse protoplasmique fluide y pénètrent lentement, comme si on avait exercé sur eux une pression; on dirait une cire fluide qui entraîne et incorpore des poussières solides. L'incorporation se fait donc par un simple contact, comme l'avait parfaitement vu *Max Schultze*. Une très simple expérience, imaginée par *Ranvier*, démontre la chose d'une façon saisissante. Si on donne à incorporer aux leucocytes, non plus des corps très petits, mais des corps relativement volumineux, de leur taille ou plus gros qu'eux, comme des grains de fécule de pomme de terre, on voit que les leucocytes s'attachent aux grains de fécule, s'étalent à leur surface en tous sens et arrivent ainsi à recouvrir complètement et à incorporer les plus petits des grains de fécule, beaucoup plus gros qu'eux cependant. L'expérience peut se faire *in vitro;* il suffit de saupoudrer très légèrement le plateau de la chambre humide de fécule de pomme de terre et de déposer ensuite la goutte de lymphe péritonéale (de grenouille ou de triton). L'incorporation des corps petits se fait par un mécanisme analogue (2).

Enfin les expériences de phagocytose peuvent se faire avec des microbes et nous en parlerons surtout plus tard à propos du rôle des leucocytes dans l'immunité. *Metchnikoff*, pour démontrer que les leucocytes absorbent bien des microbes *vivants* et non morts, s'est servi de microbes *mobiles*. Dans ses recherches, il a signalé un objet d'étude très intéressant, ce sont les spermatozoïdes. Il est facile d'aller puiser dans l'épididyme d'un cobaye ou d'un rat une minime goutte de sperme qu'on mélange *in vitro* ou *in vivo* à une quantité plus grande d'exsudat. On pourra ainsi observer parfois un spermatozoïde dont la tête est complètement incorporée, et dont la queue, hors du phagocyte, est encore mobile (3). Dans la phagocytose interviennent des phénomènes diastasiques que nous étudierons plus loin (v. ch. VII).

Les leucocytes sont aussi capables d'absorber des particules organiques diverses, et des substances alimentaires qui leur sont fournies finement émulsionnées. Cette faculté peut s'exercer sur des substances chimiques diverses, même toxiques, à condition qu'elles soient sous la forme de fines particules, et peu solubles. Elle s'exerce *in vitro* et *in vivo* sur les microbes morts et vivants. Enfin, cer-

(1) Mesnil, *Ann. Pasteur*, 1895.

(2) Voir aussi Comandon, *Soc. de Biologie*, 15 novembre 1919, et *Annales Pasteur*, 1920, et plus loin, ch. VII, Phagocytose et immunité.

(3) Metchnikoff, *Annales Pasteur*, 1899 et Immunité, p. 90.

Metalnikoff, *Annales Pasteur*, XIV, 1900. — Cantacuzène, *Annales Pasteur*, 1899.

tains faits permettent de penser que les leucocytes sont capables d'absorber des substances solubles, dans certaines conditions.

Dans la phagocytose de fines particules, de microbes, l'englobement est facilité par le contact, l'accolement du corps étranger au protoplasma du leucocyte. Cet accolement est favorisé par des phénomènes physiques (tension superficielle, adsorption) qui interviennent parfois dans une phase préparatoire.

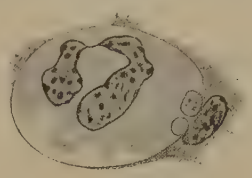


Fig. 190. — Lymphe péritonéale du triton observée *in vitro*. Deux leucocytes cherchant à englober un grain de fécule. 665 diam.

Influence des corps étrangers absorbés sur la forme du noyau. — La présence des corps étrangers phagocytés peut quelquefois modifier la forme du noyau. L'expérience est particulièrement démonstrative avec la lymphe péritonéale du triton qui, chez un animal neuf, contient surtout des cellules à noyau arrondi. On la mélange *in vitro* à une trace d'amidon pulvérisé. On attend 2 ou 3 heures, on fixe, on colore, et on monte dans la glycérine. Le noyau de beaucoup de leucocytes apparaît profondément et irrégulièrement découpé; dans chaque enfoncement du noyau se trouve un grain d'amidon. Les facettes des grains se moulent si exactement sur les découpures du noyau, qu'il apparaît avec évidence que ce sont les grains qui ont causé ces bizarres déformations. Dans certains leucocytes, très étalés sur la lame, on peut voir des grains d'amidon pénétrer dans le noyau. Cette pénétration n'est pas due à des mouvements actifs du noyau, mais à ceux du cytoplasme qui, en s'étalant, repousse naturellement vers les parties centrales les corps étrangers et arrive parfois à les enfoncer dans le noyau (1).

Fig. 191. — Lymphe péritonéale de triton. Leucocyte fixé pendant son activité. Déformation du noyau produite par la présence de grains d'amidon phagocytés. 500 diam.

Influence des mouvements protoplasmiques sur la forme du noyau. Division directe. — Le noyau des leucocytes ne semble pas en effet avoir de mouvements propres; mais il est déformé par les mouvements protoplasmiques : il est étiré par l'allongement du corps cellulaire, il est entraîné dans l'intérieur des pseudopodes; il subit enfin, passivement, des changements de forme assez rapides (2). Pourtant, ces déformations passives ne sont pas définitives, et elles ne suffisent pas à expliquer la forme compliquée du noyau polymorphe.

Si on suit, dans la lymphe péritonéale d'un triton ou d'une salamandre, les mouvements des leucocytes, on voit certaines de ces cellules qui s'étirent et se divisent en deux portions, réunies par un long et mince filament; le noyau suit ce mouvement et prend la forme d'un bissac allongé. Le plus souvent, les cellules qui se sont ainsi étirées, reviennent sur elles-mêmes et le protoplasma se fond en une seule masse. Parfois cependant, comme l'a montré *Ranvier*, le pont

(1) Jolly, *S. de Biologie*, 23 novembre 1901.
(2) Voir plus haut et Ranvier, *Archives de physiologie*, 1875.

protoplasmique se rompt : le leucocyte se divise en deux cellules nouvelles contenant chacune une portion du noyau. Cette division directe peut être observée dans la lymphe de la grenouille et dans la sérosité péritonéale des Mammifères ; mais l'observation du phénomène est plus favorable chez les Urodèles, parce qu'ici le noyau est visible dans le leucocyte vivant et qu'on peut s'assurer que le noyau a bien participé à la division.

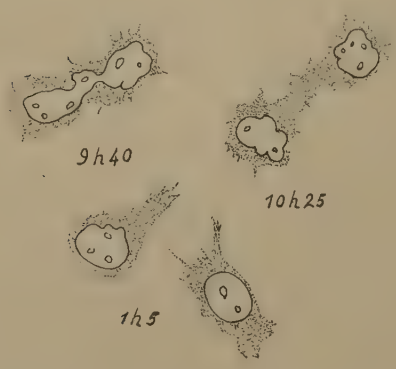


Fig. 192. — Lymphe péritonéale de l'axolotl. Division directe d'un leucocyte. D'après Ranvier.

Il est probable que cette *division directe* ne joue qu'un rôle tout à fait secondaire dans la multiplication des leucocytes. Le véritable mode de rénovation de ces cellules est la *division indirecte* ou caryocinèse, qui se fait dans les tissus hématopoiétiques.

Il n'est pas rare de trouver des leucocytes étirés dans lesquels une des deux masses protoplasmiques ne contient aucune portion du noyau. Ces masses protoplasmiques sans noyau sont capables de se séparer. Cette séparation, qui met en liberté des fragments plus ou moins importants du cytoplasme, est la conséquence de mouvements de contraction brusques partis de la masse principale (1).

Ces fragments protoplasmiques isolés et ne contenant aucun reste de noyau sont capables encore, pendant quelques instants, de mouvements amiboïdes, mais ils sont voués à une destruction rapide. Il s'agit donc là d'un phénomène de vie qui n'a rien de commun avec les faits qu'on observe sur les leucocytes en voie de destruction (émission de boules sarcodiques, lobulation du protoplasma).

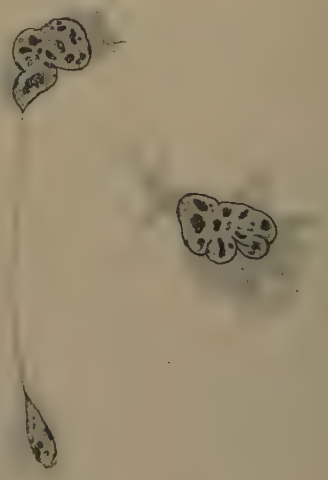


Fig. 193. — Lymphe péritonéale de triton. Leucocytes fixés pendant leurs mouvements. 800 diam.

Il est naturel de penser que ces phénomènes, qui peuvent être observés *in vitro*, se passent également *in vivo* dans les exsudats et dans le tissu conjonctif. Les leucocytes peuvent donc, sans mourir, abandonner directement au tissu dans lequel ils cheminent, des portions de leur protoplasma. Il est difficile de dire dans quelle mesure le phénomène peut servir, soit à la nutrition du tissu ambiant, soit à l'abandon de fer-

(1) Jolly, *Archives de méd. exp.*, 1898, et *S. de Biologie*, 13 mars 1909.

ments ou de substances immunisantes pouvant être formées dans le leucocyte (1).

Traversée des corps poreux. — La propriété qu'ont les leucocytes de traverser les corps poreux est, comme la phagocytose, une conséquence de l'activité protoplasmique de ces éléments.

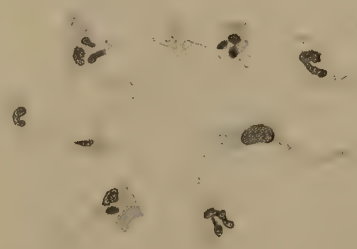


Fig. 194. — Humeur aqueuse de la grenouille examinée 24 heures après une ponction de la cornée. Leucocytes fixés pendant leur activité. Clasmatose des pseudopodes. 300 diam.

Voici comment on peut l'observer : On introduit dans le sac lymphatique dorsal d'une grenouille ou dans la cavité abdominale, un petit fragment de moelle de sureau de 1 à 2 mm. d'épaisseur et de 4 à 5 mm. de largeur. On le retire après 24 ou 48 heures. On y pratique des coupes à main levée avec un rasoir non mouillé et on examine la coupe entre lame et lamelle. On reconnaît que les grandes cellules polygonales de la moelle de sureau sont remplies de leucocytes. Les cellules périphériques en contiennent beaucoup et les leucocytes sont de plus en plus rares à mesure qu'on se rapproche du centre de la coupe. Ces globules blancs ont pénétré de proche en proche dans les cavités de la moelle de sureau à travers les petits orifices qui font communiquer ces cavités. De plus, on s'aperçoit que les globules blancs de la rangée la plus extérieure ont des formes amiboïdes et sont vivants tandis que ceux du centre sont immobiles et sphériques. Au fur et à mesure que les leucocytes se sont éloignés du milieu oxygéné, ils ont perdu leur activité et ont fini même par mourir. On peut, en effet, si l'expérience a duré assez longtemps, trouver dans les cavités centrales de la moelle de sureau des globules blancs dont le noyau est en pycnose.

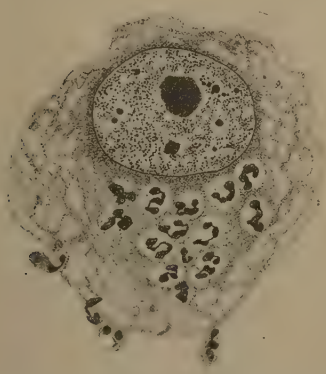


Fig. 195. — Leucocytes polynucléaires envahissant une cellule cancéreuse monstrueuse, hypertrophiée et altérée. (Épithélioma cutané). 560 diam.

On peut obtenir des préparations persistantes de ces fragments de moelle de sureau dans lesquels les leucocytes ont pénétré. On les fixe et on y pratique des coupes qu'on colore et qu'on traite comme celles de tout autre tissu.

Sur les coupes colorées, on constate que les leucocytes qui ont pénétré sont

(1) On peut donner à ces phénomènes le nom de *clasmatose*. Toutefois il convient de remarquer que le phénomène décrit par Ranvier sous ce nom est un phénomène différent (voir ch. vi).

presque tous des leucocytes à noyau polymorphe et qu'ils appartiennent ainsi à la variété douée des mouvements amiboïdes les plus actifs.

L'expérience peut être faite aussi en introduisant le fragment de moelle de sureau sous la peau ou dans la cavité péritonéale d'un mammifère. La moelle de sureau peut être remplacée par d'autres corps poreux (fragments d'éponge, d'os desséché, etc.)(1).

Les leucocytes peuvent pénétrer dans l'intérieur de petits caillots fibrineux. Si, au lieu de fibrine, on introduit dans le sac lymphatique dorsal ou la cavité péritonéale de la grenouille des fragments de gélatine ou de blanc d'œuf coagulé par la chaleur, les leucocytes n'arrivent pas à pénétrer ces fragments, mais ils les modifient cependant et les érodent, ce qui laisse penser qu'ils sont capables d'attaquer beaucoup de substances à l'aide de ferments (voir chap. VII).

La propriété qu'ont les leucocytes de pénétrer dans les corps poreux, à travers des orifices beaucoup plus petits qu'eux, permet de comprendre qu'ils ne restent pas enfermés dans le système circulatoire et qu'à travers les parois vasculaires, ils sont capables d'émigrer dans le tissu conjonctif et d'arriver jusque dans les épithéliums. Ils s'insinuent entre les cellules, digèrent les ciments intercellulaires et arrivent à pénétrer dans les cellules mêmes où, comme des parasites, ils se creusent des galeries et des logettes. Le phénomène est facile à voir sur des cellules en train de mourir, à résistance diminuée ; mais il existe déjà à l'état physiologique. Ceux qui ont englobé des déchets et des parasites peuvent ainsi les éliminer. Il est possible, comme on l'a supposé, qu'ils entraînent, de la même manière, des substances toxiques.

Diapédèse. — On désigne sous ce nom le passage des leucocytes à travers la paroi des vaisseaux. Entrevu auparavant par quelques observateurs, il a été véritablement décrit et compris par *Cohnheim* (2) dont les expériences ont fait faire un grand progrès à nos idées sur l'inflammation des tissus.

L'observation de la diapédèse peut être faite sur divers objets, sur toutes les membranes transparentes où l'on peut suivre sur l'animal vivant la circulation du sang (voir chap. I) ; mais l'un des objets les plus favorables est le mésentère de la grenouille.

On immobilise une grosse grenouille verte mâle en lui injectant sous la peau de la cuisse une ou deux gouttes d'une solution de curare à 1 p. 1.000. Lorsqu'elle est paralysée, on s'assure que le cœur bat bien et on la fixe sur le dos sur une planchette de liège. La planchette est percée d'un trou. Dans cet orifice, on enfonce un petit bouchon de liège ; il doit faire saillie d'un centimètre et demi environ et il est complètement percé de part en part pour laisser arriver la lumière ; la plaque de liège est placée sur le microscope ; l'orifice de la plaque de liège est mis en

(1) Ranvier, *Traité technique* et *Leçons sur la cornée*, Paris, 1881. Si, au lieu d'employer la moelle de sureau, on utilise pour cette expérience un fragment de tige de laminaire dont les cavités ne communiquent pas les unes avec les autres, on ne trouve pas, dans ces conditions, de globules blancs à l'intérieur des cavités. Voir aussi Recklinghausen, *Virchow's Archiv*, XXVIII, 1863.

(2) Cohnheim, *Virchow's Archiv*, XL, 1867.

regard de l'ouverture de la platine. C'est sur l'ouverture supérieure du bouchon qu'on placera le mésentère qui se trouvera ainsi tendu. Pour assurer la fixité de l'intestin, le bord de l'orifice présente une moulure saillante qui a été taillée dans le liège et qui empêche l'intestin de revenir sur lui-même. Il est bon de ménager dans la moulure, sur le côté qui regarde la grenouille, une échancrure. Cette échancrure recevra les vaisseaux mésentériques qui ne risqueront pas d'être comprimés.

Fig. 196. — Circulation dans l'aile de la chauve-souris. Veinule dans laquelle la circulation est très ralentie et qui reçoit un capillaire. Piles de globules rouges. Margination des leucocytes.

Les choses étant ainsi préparées, on pratique avec un fer rouge une incision au niveau de l'abdomen. L'incision doit être faite un peu en dehors de la ligne médiane, pour éviter la veine médiane, mais pas trop en dehors, afin de ne pas blesser la veine musculo-cutanée. Avec une pince à mors plats garnis de caoutchouc, on attire avec précaution une anse de l'intestin grêle, sans exercer de tractions. L'anse intestinale est placée sur l'orifice du bouchon de telle sorte que le mésentère se trouve tendu et éclairé par-dessous. On règle la hauteur du mésentère de telle sorte que sa surface soit plus haute que la plaie, afin d'empêcher que les liquides s'écoulant de l'incision ne viennent gêner l'observation. On dépose sur le mésentère une goutte de lymphe pure, recueillie dans l'abdomen avec une pipette au moment où l'on a fait l'incision. On recouvre d'une lamelle ; celle-ci est tenue dans les mors d'une pince à pression fixée par une boule de cire molle, sur la plaque de liège ; la lamelle ne doit pas comprimer le mésentère ; les racines des gros vaisseaux doivent passer librement dans une encoche du disque de liège.

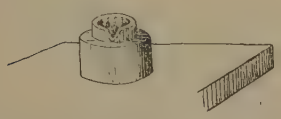


Fig. 197. — Expérience de la diapédèse. Bouchon préparé pour recevoir le mésentère de la grenouille.

Si le cœur a conservé toute sa force, la circulation, observée à un faible grossissement, apparaît extrêmement rapide dans les gros vaisseaux et dans les capillaires. Dans les artères, on ne distingue rien de net : la veine liquide apparaît vaguement striée en long par la présence des globules rouges. Dans les veines, on constate l'existence, en dehors de la partie axiale, rouge, du courant, d'une couche périphérique mince, claire, formée presque exclusivement par du plasma en mouvement et dans laquelle on distingue seulement quelques globules blancs. Si on observe avec soin cette couche marginale (couche adhésive de *Poiseuille*), on voit que les leucocytes

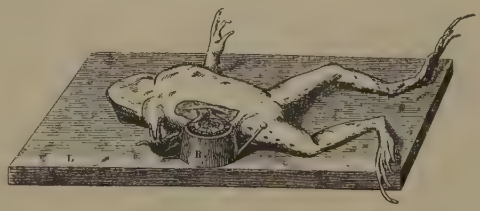


Fig. 198. — Observation du mésentère de la grenouille à l'état vivant.

L, lame de liège; — *B*, disque de liège sur lequel repose l'anse intestinale. D'après Ranvier

qui s'y trouvent ne sont pas animés de la même vitesse que le courant sanguin et que les hématies de la portion axiale. Ils cheminent beaucoup plus lentement; l'un ou l'autre s'arrête de temps en temps en s'accolant à la paroi du vaisseau, puis, au bout d'un moment, en est détaché et repris par le courant sanguin. Ce phénomène, appelé margination des globules blancs est important à connaître, parce que c'est cette observation qui conduit à celle de la diapédèse. Si on examine les capillaires qui se trouvent compris entre les rayons vasculaires, la circulation y est plus lente et les globules blancs marginaux se distinguent beaucoup mieux.

Dans les segments de capillaires où le sang circule lentement ou ne circule pas, on voit les globules blancs s'accumuler. Ce sont ces points qu'il faut observer avec attention. Certains leucocytes s'aplatissent contre la paroi vasculaire, figurant une sorte de tête de clou hémisphérique. Cette portion intravasculaire diminue progressivement de volume et finit par disparaître. En même temps, on voit apparaître en dehors de la paroi vasculaire une masse réfringente, irrégulière, qui augmente de volume progressivement et s'étale à la face externe du vaisseau. Cette portion extravasculaire a une forme amiboïde plus ou moins compliquée. On peut, comme l'a fait *Cohnheim*, rendre l'observation plus facile en injectant 24 heures à l'avance dans le sac lymphatique dorsal une poudre inerte colorée qu'absorbent les leucocytes de la lymphe ; lorsque ces leucocytes seront arrivés dans le sang, la présence de ces particules absorbées permettra de les suivre avec plus de précision pendant leur passage à travers la paroi vasculaire.

Fig. 199. — Circulation dans le mésentère de la grenouille. Margination des leucocytes. Accumulation des leucocytes dans un capillaire où le courant ne passe pas. Le courant axial formé par les hématies apparaît strié.

On ne connaît pas encore exactement le mécanisme de la diapédèse. Certains auteurs ont pensé que les leucocytes passaient à travers des stomates préformés. Plusieurs admettent encore leur existence. Il est probable que ces stomates préformés n'existent pas et que lorsqu'ils existent, ils sont la conséquence et non la cause de la diapédèse. Lorsqu'on voit la facilité avec laquelle les leucocytes traversent des revêtements épithéliaux formés de plusieurs couches de cellules, la diapédèse paraît facile à comprendre. Dans une préparation de sang frais de l'homme, il n'est pas rare de voir un leucocyte traverser une pile de globules rouges en écartant avec force les hématies, pourtant pressées les unes contre les autres. La diapédèse est un phénomène du même ordre.

Lorsque l'expérience dure depuis plusieurs heures, on voit des globules rouges s'engager à travers la paroi vasculaire. Comme ceux-ci n'ont pas de mouvements amiboïdes, les auteurs qui admettent l'existence des stomates préformés ont pris

ce fait en faveur de leur manière de voir. Il vaut mieux penser que les globules rouges passent à travers des trous formés *secondairement* par le passage des leucocytes. Le globule rouge qui est engagé dans un de ces stomates paraît étranglé en son milieu.

La diapédèse est un phénomène physiologique. Elle peut être observée sans délabrements dans les vaisseaux de la membrane interdigitale de la grenouille et dans la queue des larves de Batraciens. Dans le mésentère, elle est très active, parce que l'air excite l'activité des leucocytes et irrite les tissus qui sont mis au jour. La diapédèse peut être observée aussi chez les Mammifères, mais dans des conditions plus difficiles : la vessie, le mésentère du rat, le mésentère du cobaye, l'épiploon du chien, la membrane alaire de la chauve-souris pourront être utilisés.

Le phénomène est accéléré ou empêché par toutes les causes qui favorisent ou gênent le mouvement protoplasmique des leucocytes. Le seul fait de remplacer la lymphe qui arrose le mésentère, par de l'eau salée isotonique, gêne l'expérience ; c'est ce qu'il faut se rappeler quand on veut étudier l'action de diverses substances, employées directement ; il faut les dissoudre dans la lymphe même.

Le phénomène de la diapédèse peut être observé sur des préparations fixées ou colorées ; le mésentère qui a servi à l'expérience peut être traité de cette façon (voir ch. I). Le tissu conjonctif enflammé de l'homme et des animaux, au voisinage d'une ulcération quelconque de la peau, au niveau des bourgeons charnus, montrera ce fait très nettement. On constatera que la plupart des leucocytes qui passent ainsi à travers les vaisseaux sont des leucocytes polynucléaires ; les leucocytes éosinophiles et les lymphocytes sont capables aussi de diapédèser, mais d'une manière beaucoup moins active (1).

Composition chimique des leucocytes. — Les substances qui entrent dans la constitution chimique des leucocytes sont les mêmes que celles que l'on trouve dans les éléments cellulaires en général (2). Cependant, ils sont particulièrement riches en nucléo-protéides, comme le montrent les analyses du pus et du tissu lymphoïde (3). Par leurs noyaux, ils sont riches aussi en chaux. A ces constituants s'ajoutent des réserves, graisse, glycogène, fer, etc. Le glycogène du sang est surtout transporté par les leucocytes. Lors de l'ingestion de substances grasses, de préparations ferrugineuses, on retrouve ces substances dans les leucocytes contenus dans les lymphatiques de l'intestin. Enfin les leucocytes contiennent des diastases énergiques (diastase protéolytique, amylase, oxydases, etc.) qui interviennent dans la phagocytose et peut-être dans l'absorption et les échanges (4).

Répartition des leucocytes chez les Vertébrés. Leucocytes chez les Invertébrés. — Chez les Vertébrés, les leucocytes existent dans le sang,

(1) Voir ch. VI.

(2) Voir les Traités de Biochimie.

(3) Cette richesse en nucléo-protéides fait que la destruction de nombreux globules blancs, dans la leucémie, dans la période de résorption des exsudats purulents, etc., est suivie d'une forte élimination d'acide urique par les urines. De la même manière, l'ingestion de tissu lymphoïde et en particulier de thymus de veau fait apparaître l'acide urique en grande quantité dans les urines. Les nucléoprotéides contenus dans le tissu lymphoïde semblent y être en partie tenus en réserve pour être livrés à l'organisme et utilisés dans certaines circonstances (voir ch. XVIII).

(4) Voir ch. VII. Les leucocytes contiennent du zinc (Delezenne, *Annales Pasteur*, XXXIII, 1919).

dans la lymphe et dans les liquides des cavités séreuses. Dans le sang, on trouve les différentes variétés que nous avons étudiées ; dans la lymphe, les lymphocytes dominent, parfois presque exclusivement ; à côté d'eux on trouve des grands mononucléaires qui proviennent de la paroi endothéliale des sinus ganglionnaires. Enfin, grâce à la diapédèse et à la migration, les leucocytes cheminent aussi dans le tissu conjonctif où ils peuvent, du reste, prendre naissance, et où nous les étudierons dans le chapitre suivant.

Fig. 200. — *Helix pomatia.* Sang du cœur. Mouvements d'un leucocyte observés à 17°.300 diam.

Chez les Invertébrés, on trouve aussi des leucocytes dans le liquide de la cavité générale, dans le tissu conjonctif et dans le sang lorsqu'il existe un liquide sanguin spécial. Les caractères et les propriétés générales de ces éléments sont à peu près les mêmes que chez les Vertébrés. Lorsqu'on les examine, par exemple à l'état frais, dans le liquide sanguin incolore de l'écrevisse, puisé dans le cœur ou retiré simplement par piqûre de la carapace, ils montrent, à la température du laboratoire, comme les leucocytes des Batraciens, des mouvements amiboïdes et poussent des pseudopodes larges, ramifiés, qui ont une grande tendance à s'enchevêtrer les uns dans les autres, sans s'anastomoser véritablement. Une observation du même genre peut être faite sur les leucocytes du liquide cavitaire incolore du lombric. Ces apparences d'anastomoses entre pseudopodes peuvent du reste être observées chez les Vertébrés, par exemple dans la lymphe péritonéale des Batraciens urodèles. Ces cellules sont donc mobiles, d'où le nom d'amibocytes qui leur est donné souvent ; elles sont capables de phagocytose ; elles sont douées d'une sensibilité chimio-tactique.

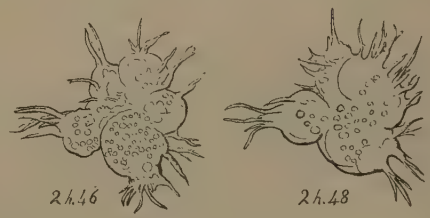


Fig. 201. — Liquide cœlomique du lombric. Mouvements pseudopodiques synergiques d'un groupe de leucocytes agglomérés. 400 diam.

Les variétés d'aspect de ces cellules sont beaucoup plus nombreuses encore que chez les Vertébrés. Les unes ont un corps protoplasmique hyalin, d'autres portent des granulations très diverses, comme dimensions et comme réactions. Ces variétés cellulaires sont parfois nombreuses dans la même espèce. Elles diffèrent, d'un groupe à l'autre, et souvent d'une espèce à une autre espèce. Aussi est-il assez difficile de faire ici, pour le moment, des catégories nettement déterminées. En tout cas, ce serait un abus de généralisation que de vouloir les superposer aux variétés cellulaires que nous avons étudiées chez les Vertébrés.

Ces variétés d'aspect se voient déjà chez les Cœlentérés. Dans le tissu mésodermique des Spongiaires, on trouve des cellules libres portant des granulations et sphérules dont les unes se colorent par les colorants basiques et dont les autres se colorent par les colorants acides (1). Dans le liquide cœlomique des Oursins, on

(1) Cotte, *Bull. sc. de la France et de la Belgique*, XXXVIII, 1904. — Kollmann, Th. sc., Paris, 1908.

trouve de petits leucocytes hyalins à noyau unique, de gros leucocytes hyalins à noyau en biscuit ou divisé et des cellules granuleuses dont les grosses granulations ou sphérules ont en général une affinité prédominante pour les couleurs basiques (1). Des leucocytes du même genre on été trouvés dans le liquide cœlomique des Astéries (2). Le liquide périviscéral des Holothuries (3) contient des leucocytes hyalins, grands et petits, dont le noyau sphérique devient rarement polymorphe, des leucocytes granuleux à granulations acidophiles et basophiles qui ne paraissent pas exister chez toutes les espèces, et des cellules sphéruleuses à réactions amphophiles, facultatives, avec prédominance pour les couleurs basiques.

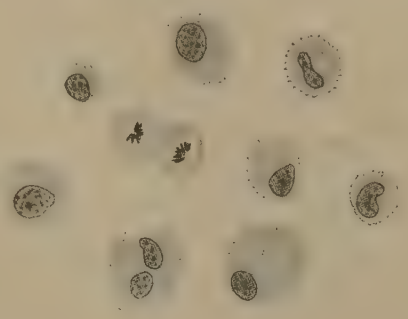


Fig. 202. — Lymphe cœlomique du lombric. Sublimé acétique; hématéine, éosine. Leucocytes. L'un d'eux est en mitose. 800 diam.

Les leucocytes du liquide cavitaire des Oursins, examinés à l'état frais, poussent de longs prolongements capables de former avec ceux des cellules voisines, des anastomoses apparentes. C'est ce qui constitue la pseudo-coagulation du sang des Oursins qui n'a absolument rien de commun avec la précipitation de la fibrine dans le sang des Vertébrés. Cette curieuse propriété permet aux Oursins d'obturer rapidement les petits trous qu'on pratique dans leur test. La plupart des auteurs qui ont étudié la formation de ces anastomoses admettent qu'il s'agit d'une fusion des leucocytes en un plasmode ; rien n'est moins certain cependant et il est probable que le plus souvent, il ne s'agit que d'accolements.

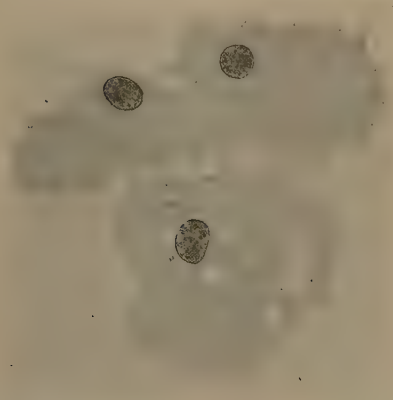


Fig. 203. — Lombric. Liquide cœlomique conservé *in vitro* sans réactifs, puis fixé et coloré après 30 minutes. Cellules lymphoïdes qui se sont étalées sur le plancher de la chambre humide et ont pris un aspect endothéliforme. 525 diam.

Chez les Annélides, il existe un liquide sanguin différencié, contenu dans des vaisseaux et distinct du liquide de la cavité générale. Ce sang est parfois incolore ou coloré en vert, mais souvent il est rouge, coloré par l'hémoglobine dissoute dans le plasma. On y trouve des leucocytes, ordinairement moins nombreux et moins variés d'aspect que dans le liquide

(1) Cuénot, *Archives de zool. exp.*, 1889 et 1891. — *Archives de biologie*, XI, 1891. — *Archives d'an. micr.*, I, 1897. — Prouho, *Archives de zoologie expérimentale*, 1887. — Kollmann, *l. c.*

(2) Cuénot, *Arch. zool. exp.*, 1901.

(3) Hérouard, *Archives de zool. exp.*, 1889. — Cuénot, *Archives de biologie*, 1891. — Kollmann, *l. c.*

cavitaire qui, de plus, chez un certain nombre d'espèces, surtout chez les Polychètes, renferme des hématies (1).

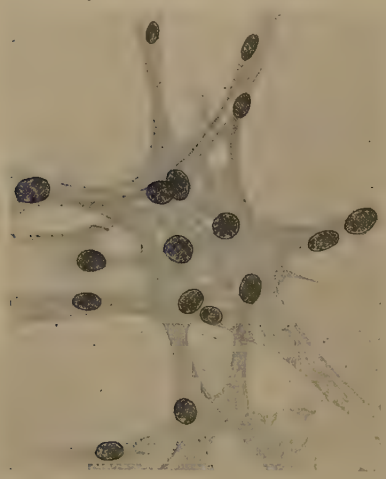


Fig. 204. — Lombric. Liquide cœlomique conservé *in vitro* sans réactifs, puis fixé et coloré après 30 minutes. Pseudo-tissu formé par les cellules lymphoïdes anastomosées, mais non confondues. 450 diam.

Dans le sang rouge du lombric, les leucocytes sont très peu nombreux. Ce sont en général des cellules petites, dont les unes ont un protoplasma hyalin, dont les autres portent des granulations acidophiles. Ces leucocytes possèdent des mouvement amiboïdes, en général peu énergiques. Dans le liquide cavitaire, on trouve de nombreuses cellules amiboïdes incolores. Les unes, de petite taille, ont un protoplasma hyalin et un noyau arrondi ; d'autres ont un corps protoplasmique plus large et hyalin et un noyau arrondi, ovalaire, quelquefois double. Ces éléments peuvent présenter des mitoses. On observe souvent dans leur protoplasma des grains de glycogène. Enfin, d'autres amibocytes portent des granulations de dimensions variées colorables par les couleurs acides.

A côté des leucocytes, qui existent chez tous les Oligochètes, on rencontre, chez quelques espèces (*Allobophora*) des cellules libres plus volumineuses, immobiles, contenant de gros grains jaunâtres d'apparence graisseuse, insolubles dans l'eau et solubles dans l'alcool absolu (éléocytes). Ces cellules sont parfois si nombreuses qu'elles donnent au liquide cœlomique un aspect lactescent et une coloration jaunâtre.

Les amibocytes des Oligochètes, comme les amibocytes des Échinodermes, sont capables de phagocyter les substances pulvérulentes colorées qu'on injecte en suspension dans le cœlome (encre de Chine, carmin pulvérisé, etc.). Cette phagocytose est surtout le fait des leucocytes hyalins. Les leucocytes granuleux possèdent beaucoup moins cette propriété. Les leucocytes hyalins absorbent de la même manière les cellules nécrosées, les parasites et tous les déchets solides. Ils les transportent au niveau de l'épiderme, dans les parois du tube digestif et peuvent aussi les éliminer à travers les pores dorsaux. Ces phagocytes bourrés de déchets s'accumulent aussi parfois dans les derniers segments du corps, où ils sont poussés par les contractions du ver. Enfin, lorsqu'ils rencontrent un objet d'un certain volume, ils l'entourent à plusieurs, sécrètent autour de lui une substance amorphe disposée en couches concentriques. Ces kystes, au centre desquels on rencontre souvent des parasites volumineux (grégarines et nématodes)

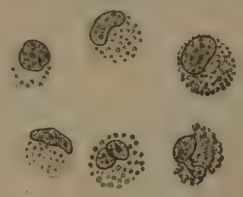


Fig. 205. — Sang du cœur du lombric. Leucocytes à granulations éosinophiles. 830 diam.

(1) Voir ch. II.

sont parfois rejetés par les pores dorsaux qui font communiquer le cœlome avec l'extérieur (1). En plus de ce rôle éliminateur par phagocytose, certains leucocytes des Échinodermes et des Oligochètes ont la propriété de fixer des matières colorantes solubles avec élection. Si l'on injecte par exemple une solution de carmin ammoniacal dans le cœlome d'un lombric, on retrouve dans le sang des vaisseaux, de petits amibocytes chargés de carmin précipité ou montrant des vacuoles ou des grains, colorés par le carmin non précipité. Ces faits ont été interprétés par *Cuénot* et par *Bruntz* comme une fonction de fixation élective et d'excrétion, dévolue à ces leucocytes (2).

Chez les Annélides Polychètes, le sang contenu dans les vaisseaux est très souvent rouge, comme chez le lombric, couleur due à de l'hémoglobine dissoute dans le plasma. Il contient des amibocytes. Le liquide cœlomique renferme des leucocytes hyalins à noyau arrondi et des leucocytes à granulations acidophiles, à noyau arrondi ou polymorphe ; chez certaines espèces, on y trouve des hématies (3). Ces hématies existent aussi, chez beaucoup de Géphyriens, dans le liquide de la cavité générale ; on trouve à côté d'elles des amibocytes hyalins, des leucocytes à granulations acidophiles, et des cellules sphéruleuses, dont les propriétés amiboïdes sont douteuses et dont les grains énormes prennent surtout les colorants basiques.

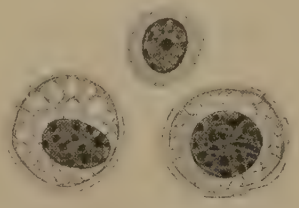


Fig. 206. — Ecrevisse. Hémolymphe. Un lymphocyte et deux leucocytes granuleux. 840 diam.

Chez les Arthropodes, le système vasculaire est en général beaucoup moins développé que chez les Annélides les plus perfectionnés. Le sang est moins différencié ; le plus souvent, il est incolore et identique au liquide des cavités périviscérales. Chez les Crustacés (4), il est incolore, transparent; il contient en suspension de nombreux leucocytes mobiles et pas d'hématies. Il ressemble un peu, par son aspect et sa constitution histologique, à la lymphe des Vertébrés. Certains leucocytes ont un protoplasma hyalin, un noyau arrondi, et montrent à l'état frais des mouvements amiboïdes ordinaires ; d'autres portent des granulations réfringentes, acidophiles. Ce sont eux qui poussent des pseudopodes en s'enchevêtrant avec les cellules voisines. Le noyau, ordinairement arrondi, est parfois étiré en fer à cheval, ce qui, pas plus que chez les Vertébrés, n'a la signification d'une division directe, comme on l'a admis quelquefois. Toutes ces cellules sont mobiles et capables de phagocytose. On trouve des formes intermédiaires entre les leucocytes hyalins et les leucocytes à granulations acidophiles.

(1) Cuénot, *Archives de biologie*, XV, 1898. — Rosa, *Archives italiennes de biologie*, XXV, 1896. — Benham, *Quart. J. micr. sc.*, XLIV, 1901. — Dans le liquide cavitaire, les leucocytes sont souvent mélangés à des éléments étrangers, surtout à des produits sexuels et à des cellules épithéliales appartenant au revêtement cœlomique (cellules chloragogènes).

(2) De nombreuses causes d'erreurs se glissent d'ailleurs dans l'interprétation de ces faits qui relèvent parfois de la simple phagocytose s'exerçant sur une substance précipitée ou de phénomènes de teinture. Des amibocytes ayant la même propriété existent dans le liquide cœlomique de Bryozoaires. Voir aussi ch. xi.

(3) Voir ch. ii et Cuénot, *Arch. zool. exp.*, 1891. — Kollmann, Th. 1908. — Kukenthal, *Jenaische Zeitschrift*, XVIII, 1885.

(4) Cuénot, *Archives de biologie*, XIII, 1895.
Bruntz, *Archives de zool. exp.*, 1907. — Kollmann, Th., 1908.

D'après les expériences de *Kollmann* faites chez *Carcinus mœnas*, la proportion des leucocytes granuleux contenus dans le sang diminuerait notablement chez les individus soumis à un jeûne rigoureux de plusieurs semaines, tandis qu'elle augmenterait au contraire légèrement chez les individus renourris après le jeûne. La mue, qui coïncide avec une période d'inanition, aurait le même effet que le jeûne.

Le liquide sanguin incolore de beaucoup de crustacés bleuit légèrement à l'air et contient de l'hémocyanine (1). On ne trouve d'hémoglobine dissoute dans le plasma que chez un très petit nombre d'espèces. On ne connaît pas d'espèces possédant des hématies. Il en est de même chez les Insectes dont quelques rares espèces possèdent de l'hémoglobine (larves de *Chironomus*) et dont le sang ne possède pas en général de pigments respiratoires bien déterminés (2).

Chez les Aranéides, on trouve dans le sang, à côté de leucocytes hyalins, des leucocytes à granulations acidophiles et à noyau souvent polymorphe. Il en est de même chez les Scorpions. Les granulations ont parfois l'aspect bacilliforme ; leur affinité pour les couleurs acides varie, semble-t-il, avec l'évolution. A côté de ces leucocytes granuleux, on trouve des cellules sphéruleuses, dont les grains volumineux prennent les couleurs basiques (3). Dans le sang des Myriapodes, on peut trouver aussi, à côté des leucocytes hyalins, des leucocytes granuleux (4).

Le liquide sanguin de quelques espèces d'Insectes paraît dépourvu d'éléments figurés ; chez la plupart cependant on y trouve des leucocytes (5). Chez beaucoup d'entre eux, on ne trouve que des leucocytes hyalins ; les leucocytes granuleux semblent constants au contraire chez les Orthoptères ; ces granulations ont en général une affinité pour les couleurs acides ; on trouve aussi des cellules sphéruleuses, dont les sphérules, basophiles, peuvent être mises en liberté dans le plasma sanguin (6).

La granulation azurophile est très développée dans les leucocytes du sang de quelques espèces d'Insectes (7), Dans le sang de *Carausius morosus*, on la rencontre dans toute la série des leucocytes hyalins, lymphocytes et mononucléaires. Les granulations, souvent contenues dans des vacuoles, semblent augmenter de nombre au fur et à mesure que l'élément cellulaire évolue ; en même temps le protoplasma du leucocyte perd graduellement son affinité pour les couleurs basiques. Chez les larves adultes de *Galleria mellonella*, on assiste à des phénomènes du même genre. D'abord isolées, les granulations azurophiles augmentent de nombre et finissent par remplir une grande partie du protoplasma du leucocyte. Elles prennent une forme irrégulière, perdent leur individualité et diffusent enfin dans le cytoplasme, d'où l'apparition d'îlots irréguliers, de plages azurophiles. Ces faits permettent de penser qu'il s'agit là d'un phénomène sécréteur et que ces granulations jouent un rôle dans l'activité élaboratrice des leucocytes.

Chez certains Lepidoptères (*Heteroginis*), le sang de la larve contient, à côté de lymphocytes et mononucléaires, des cellules dont le protoplasma est bourré de sphérules très solubles dans l'alcool et formées probablement de lipoïdes. Au stade

(1) Voir ch. IV.
(2) Voir ch. IV et ch. XVIII.
(3) KOLLMANN, l. c. chez *Buthus occitanus*.
(4) DUBOSCQ, *Archives de zoologie exp.*, 1898.
(5) KOLLMANN, *l. c.* — CUÉNOT, *l. c.* — CUÉNOT, *Archives de biologie*, XIV, 1896. — HENNEGUY, *les Insectes*, Paris, 1901.
(6) HOLLANDE, *Archives de zool. exp.*, 1909 et 1911.
(7) ZOTTA, *Réunion biologique de Bucarest*, 1920 et *Soc. de Biologie*, 21 mai 1921.

qui précède la formation de la chrysalide, le sang de la chenille est bourré de ces éléments qui disparaissent pendant la métamorphose. Il est donc probable que les substances mises en réserve par ces cellules sous forme de sphérules sont utilisées par l'insecte au moment de l'histogénèse des tissus imaginaux (1).

La part que prennent les amibocytes des Insectes à l'histolyse larvaire n'est pas encore bien élucidée (2); il semble que l'importance de la phagocytose dans la disparition des tissus inutilisés varie suivant les espèces, et que le plus souvent, les phagocytes incorporent et font disparaître des éléments déjà en voie de dégénérescence. Nous sommes encore beaucoup moins bien renseignés sur le rôle que jouent les amibocytes dans le transport et la transformation des substances de réserve amassées pendant la vie larvaire et qui servent de nourriture à l'insecte pendant la période nymphéale. Chez beaucoup d'insectes, on peut, au moment de la métamorphose, trouver dans le sang, à côté des leucocytes, des cellules du corps adipeux. Ce sont de grosses cellules, renfermant, à côté de gouttelettes de graisse, des globules de substances albuminoïdes colorables pour les couleurs acides. Elles ressemblent aux cellules sphéruleuses qu'on rencontre, par exemple, chez les Annélides. Elles proviennent de la dissociation partielle du corps adipeux, au moment de la métamorphose.

Chez les Arthropodes, le sang se confond à peu près avec le liquide périviscéral. Il en est de même chez les Mollusques, bien que le système circulatoire soit chez eux, en général, beaucoup mieux développé. Leur sang est souvent incolore; il contient fréquemment de l'hémocyanine. Chez quelques rares espèces, il renferme de l'hémoglobine dissoute (*Planorbis*). Chez quelques Lamellibranches (*Arca*, *Solen*) et Amphineures (*Neomenia*) il contient des hématies. Chez tous, il renferme des leucocytes. Chez la plupart des espèces de Gastéropodes, ces leucocytes sont seulement des leucocytes hyalins ; il en est de même chez les Amphineures. Par contre, le sang des Céphalopodes (*Sepia*, *Eledone*, *Octopus*) contient de nombreux leucocytes à granulations acidophiles qui, par leurs réactions colorantes et l'aspect souvent bilobé de leur noyau, rappellent les leucocytes éosinophiles de beaucoup de Vertébrés (3).

Le sang des Tuniciers est un liquide clair qui contient des leucocytes hyalins et des leucocytes granuleux dont les affinités colorantes varient suivant les espèces; elles sont parfois franchement acidophiles, parfois amphophiles. Enfin le sang de l'Amphyoxus ne contient aussi que des amibocytes et pas d'hématies.

Chez un certain nombre d'espèces d'Annélides, de Mollusques, d'Insectes, on peut suivre, dans le sang même, la différenciation d'un lymphocyte en gros amibocyte hyalin ou en leucocyte granuleux. Dans certains cas même (Oligochètes, Orthoptères, Aranéides et Scorpionides, Lamellibranches, etc.) on peut observer des mitoses de ces cellules, dans le sang même. Le plus souvent cependant, le remplacement et la différenciation de ces cellules se fait, comme chez les Vertébrés, en différents points du mésenchyme et même dans des organes lymphoïdes particuliers (4).

(1) Hollande, *S. de Biologie*, 31 mai 1913.
(2) Voir ch. VII.
(3) Kollmann, *l. c.* — Cuénot, *Archives de biologie*, XII, 1892, et *Archiv. d'an. micr.*, 1897. — Knoll, *Silz. d. K. Ak. Wiss. Wien*, CII, 1893.
(4) Voir ch. XI et M. Prenant, *Archives de morphologie*, 1922.

CHAPITRE VI

MIGRATION DES LEUCOCYTES. EXSUDATS. LEUCOCYTES DU TISSU CONJONCTIF ET DES LIQUIDES DE L'ORGANISME

Les leucocytes ne se rencontrent pas seulement dans le sang et dans la lymphe. Ce sont des cellules répandues par tout l'organisme et on les trouve normalement dans le tissu conjonctif. Grâce à leur faculté de traverser la paroi des vaisseaux, ils peuvent cheminer dans les tissus ; ils émigrent et forment, dans le tissu conjonctif, ce qu'on appelle les *cellules migratrices*.

Manière d'observer la migration des leucocytes. — Le phénomène de la migration des leucocytes a été découvert par *Recklinghausen* en 1863 (1). Examinant une cornée de grenouille à l'état vivant, il vit que certaines cellules, situées dans l'intérieur de cette membrane, présentaient des déformations actives et se déplaçaient. L'analogie de ces mouvements avec ceux des globules blancs de la lymphe et du sang le conduisit à penser qu'il s'agissait là des mêmes éléments. Cette manière de voir, appuyée par des expériences ingénieuses que nous allons rappeler, fut confirmée un peu plus tard, par les expériences de *Cohnheim* sur la diapédèse (2).

Pour observer les cellules migratrices à l'état vivant, il faut recueillir la cornée d'une grenouille. On a préparé à l'avance une chambre humide, plus profonde que celle dont on se sert pour observer le sang ou la lymphe, car elle doit recevoir la cornée. On la réalise facilement avec des bordures de paraffine ; mais on peut aussi se servir de petites chambres humides formées par une lame porte-objet sur laquelle a été appliquée et collée à l'aide de baume de canada, une lame plus petite, épaisse de 2 mm. environ et percée d'un orifice circulaire, de 8 mm. de diamètre.

On immobilise une grenouille en lui détruisant la moelle épinière et le cerveau. Faisant ensuite saillir le globe oculaire au moyen de l'index de la main gauche introduit dans la cavité buccale, on saisit de la main droite une pipette et on intro-

(1) Recklinghausen, *Virchow's Archiv*, XXVIII, 1863.

(2) Cohnheim, *Virchow's Archiv*, XL, 1867. La diapédèse avait déjà été vue en 1846 par *Waller;* mais ces observations avaient passé inaperçues.

duit son extrémité effilée et coupante dans la chambre antérieure de l'œil, en piquant au niveau du limbe cornéen. Quand l'humeur aqueuse a été recueillie en quantité suffisante, on dépose la pipette, on prend de fins ciseaux pointus et courbes, et une des branches étant introduite dans la chambre antérieure, on découpe toute la cornée. On peut d'abord enlever l'œil, et découper ensuite la cornée. On peut encore, d'un coup de ciseaux, réséquer toute la partie antérieure du crâne avec les deux yeux ; on la fixe à plat sur un liège avec des épingles enfoncées dans le museau ; on opère ensuite comme précédemment.

La cornée extirpée est portée sur une lame dans une petite goutte d'humeur aqueuse, sa face postérieure vers l'observateur. A l'aide d'un pinceau, qui doit être petit afin d'absorber peu d'humeur aqueuse, et à l'aide d'une aiguille à dissocier maniée prudemment, on débarrasse la membrane des portions d'iris qui y sont encore adhérentes, ainsi que des grains de pigment. A l'aide de fins ciseaux droits, on pratique alors sur les bords de la cornée, suivant des méridiens, quatre ou cinq entailles, qui permettront à la membrane, naturellement convexe, de s'étaler régulièrement. Lorsqu'elle a été bien nettoyée sur ses deux faces, on la porte avec le pinceau sur une lamelle bien propre, la face postérieure appliquée contre la lamelle, et on a soin qu'elle baigne dans une goutte d'humeur aqueuse. On retourne la lamelle sur la chambre humide et on lute à la paraffine. Si la goutte d'humeur aqueuse recueillie dans l'œil avec la pipette ne suffit pas, on recueille aussi à l'avance l'humeur aqueuse de l'autre œil (1).

La chambre humide étant portée sur la platine du microscope, on observe la cornée avec un objectif à sec, à un grossissement assez fort. La cornée est formée essentiellement d'une membrane conjonctive revêtue sur sa face antérieure d'un épithélium stratifié, continuation de l'épiderme, et sur sa face postérieure d'un endothélium qui limite en avant la chambre antérieure du globe oculaire. C'est cet endothélium qui est ici tourné vers l'observateur ; comme il est très mince, on peut, en variant la mise au point, plonger facilement dans l'épaisseur de la membrane (2).

Au début de l'observation, on ne distingue que très peu de détails. Cela tient à la transparence parfaite de la cornée dont tous les éléments sont noyés dans une masse de réfringence homogène. En abaissant l'objectif, on reconnaît, à leur contour polygonal, les cellules de l'épithélium antérieur ; en mettant au point dans l'épaisseur de la membrane, on distingue quelques nerfs et, de place en place, des corpuscules plus réfringents qui correspondent aux cellules migratrices. Mais pour les bien observer, il faut attendre que l'image se soit améliorée et qu'on puisse apercevoir les cellules conjonctives. Par son bord sectionné, la cornée absorbe progressivement l'humeur aqueuse ; les lames conjonctives s'imbibent et leur réfringence diminue ; les cellules au contraire n'absorbent pas de liquide et gardent leur réfringence première ; se trouvant dans un milieu moins réfringent, elles deviennent, par cela même, nettement visibles.

(1) Il est nécessaire d'examiner la cornée dans son propre milieu. Il ne faut pas prendre l'eau salée isotonique, qui altère à la longue les cellules ; il ne faut pas utiliser la lymphe des sacs lymphatiques ou des cavités viscérales dont les leucocytes propres gêneraient l'observation.

(2) La charpente conjonctive de la cornée est formée de lames superposées, parallèles, sauf dans les couches superficielles. Chacune de ces lames est formée de faisceaux conjonctifs parallèles ; dans deux lames consécutives, les faisceaux se coupent à angle droit (voir Ranvier, *Leçons sur la cornée*, Paris, 1881, et *Traité technique d'histologie*).

Les cellules conjonctives de la cornée de la grenouille ont l'aspect de corpuscules étoilés formés d'un corps protoplasmique aplati dans le plan de la membrane et d'où partent des prolongements minces et ramifiés. Ces prolongements sont étendus dans deux directions seulement, et leurs axes se coupent à angle droit. Cela tient à ce que ces cellules sont situées entre les lames cornéennes dont les faisceaux constitutifs sont parallèles dans le même plan, mais perpendiculaires les unes aux autres quand on considère deux plans successifs. Les *crêtes d'empreinte* produites par les faisceaux sur une des faces de la cellule sont naturellement perpendiculaires à celles de la face opposée.

En poursuivant l'observation, on aperçoit d'autres cellules, qui se distinguent des précédentes par leur réfringence plus grande, leur taille plus petite, leur forme irrégulière. Par suite de leur réfringence, ces éléments se voient nettement à un moment où les cellules étoilées sont encore peu distinctes.

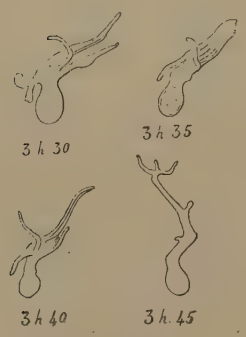


Fig. 207. — Cornée de la grenouille (R. T.) examinée à l'état vivant. Mouvements d'une cellule migratrice.

En observant avec attention ces nouveaux éléments, on ne tarde pas à les voir changer de forme ; leurs prolongements s'allongent, se rétractent ; ces déformations et ces mouvements amiboïdes s'accompagnent d'un déplacement de toute la cellule que l'on voit ramper ainsi dans l'épaisseur de la cornée. Ces mouvements sont accélérés par l'élévation de température ; ils sont plus actifs si la préparation est placée sur une platine chauffante à une température de 25°. Dans l'humeur aqueuse, on peut suivre ces mouvements pendant fort longtemps, pendant des heures et des jours consécutifs. Si au contraire, on observe, dans les mêmes conditions, les cellules étoilées, on n'y constate jamais aucune espèce de mouvements.

L'observation de la cornée vivante permet donc de distinguer dans cette membrane deux espèces de cellules : des *cellules fixes* et des cellules qui se déplacent ou *cellules migratrices*.

Les déformations actives que présentent les cellules migratrices sont très analogues à celles que montrent les leucocytes de la lymphe péritonéale examinés *in vitro*. Le plus souvent, un des côtés de la cellule est arrondi et massif, très réfringent, tandis que de l'autre partent des pseudopodes de forme variée ; leur noyau est invisible ; d'autres cellules sont étalées en une mince lame frangée sur les bords.

Les cellules qui se sont étalées ne présentent que des mouvements pseudopodiques minimes ; elles ne se déplacent pas. Celles qui se présentent sous la forme d'une grenade changent de place en même temps qu'elles se déforment. Leur trajet est très irrégulier, puisque cheminant dans les interstices de la cornée, elles rencontrent à chaque instant des obstacles. Les cellules aplaties sont situées entre deux lames cornéennes ; les autres sont situées aussi entre les lames ; mais leurs pseudopodes s'insinuent entre les faisceaux qui composent ces lames, de sorte que leur disposition rappelle souvent, quoique d'une manière moins régulière, celle des prolongements des cellules fixes, orientés suivant deux directions perpendiculaires l'une à l'autre. Lorsque les cellules migratrices ont pénétré dans l'épaisseur des lames cornéennes, elles se trouvent comprimées entre les faisceaux conjonctifs et prennent l'aspect d'un fuseau et parfois d'un

fagot, aspect dû à l'empreinte profonde formée par les faisceaux conjonctifs parallèles (1).

Lorsqu'on suit les mouvements des cellules migratrices dans la cornée vivante de la grenouille, il semble que ces cellules ne sont pas absolument libres d'aller dans toutes les directions ; cela tient, comme nous venons de le voir, à ce qu'elles sont obligées de s'introduire dans les interstices séparant les lames et les faisceaux qui constituent les lames. Cette observation avait conduit *Reklinghausen* à admettre que les cellules migratrices, dans leurs déplacements, suivaient des voies préétablies : *les canaux du suc*. Cette conception reposait sur une fausse interprétation des images données par l'imprégnation d'argent. Le plus souvent, l'argent est réduit dans les espaces intercellulaires ; lorsque les cellules sont contiguës, sans prolongements, comme dans les endothéliums, elles apparaissent claires, limitées par des lignes noires. Lorsque les cellules, comme les cellules conjonctives de la cornée de la grenouille, sont espacées et anastomosées par leurs prolongements, l'imprégnation d'argent, négative, obtenue très simplement en frottant la face antérieure de la cornée extirpée avec un crayon de nitrate d'argent, donne des images dans lesquelles les cellules et leurs prolongements sont réservées en clair et se détachent sur un fond coloré en brun. *Recklinghausen* a cru que ces parties réservées étaient creuses ; d'où l'explication de sa théorie. Mais on peut obtenir des imprégnations positives, où ce sont les cellules mêmes qui sont colorées par l'argent (2). On peut obtenir d'excellentes imprégnations positives par l'or (3). Enfin, on peut isoler complètement ces cellules avec leurs prolongements (4).

Les cellules migratrices fixent l'or énergiquement ; elles se colorent plus fortement que les cellules conjonctives ; on les distingue facilement sur les cornées imprégnées par l'or ; la cornée du triton crêté est un excellent objet.

La fixation de la cornée de la grenouille par les vapeurs d'acide osmique (pendant 10 à 15 minutes) permet d'obtenir les cellules migratrices immobilisées dans leurs formes amiboïdes. Après avoir raclé les épithéliums au scalpel, la cornée est examinée à plat dans la glycérine. Les cellules migratrices apparaissent réfringentes, avec le même aspect qu'à l'état vivant. Mais cette méthode ne permet pas de les colorer. Pour obtenir des préparations colorées, il faut fixer par un mélange

(1) Ces cellules ont été désignées par Ranvier sous le nom de cellules *interfasciculaires* ou *intralamellaires* par opposition aux premières ou cellules *interlamellaires*. Dans la cornée de la grenouille examinée à l'état vivant, les cellules interlamellaires sont seules bien visibles ; les cellules interfasciculaires sont très difficiles à reconnaître ; il faut, pour les voir, s'adresser à d'autres méthodes.

(2) On fait macérer deux ou trois jours dans l'eau distillée une cornée dans laquelle on a déterminé une imprégnation négative.

(3) La cornée de la grenouille est placé dans du jus de citron fraîchement exprimé et filtré ; au bout de cinq minutes on la lave un instant dans l'eau distillée ; on la porte dans 2 à 3 cc. d'une solution de chlorure double d'or et de potassium à 1 p. 100 où elle séjourne un quart d'heure ; elle est ensuite lavée rapidement une seconde fois dans l'eau distillée et placée dans un flacon contenant 50 cc. d'eau distillée à laquelle on ajoute 2 gouttes d'acide acétique. On abandonne à la lumière du jour ; la réduction est obtenue en vingt-quatre heures ; on lave à l'eau distillée, on enlève au pinceau les épithéliums ; la cornée est entaillée sur ses bords, étalée sur lame et montée dans la glycérine.

(4) Ces cellules peuvent être isolées par macération de la cornée dans l'acide sulfurique après fixation par les vapeurs osmiques (voir Ranvier, *Leçons sur la cornée*). On obtiendra de meilleurs résultats en employant une solution de potasse à 40 p. 100 que l'on fait agir à chaud sur la cornée fixée préalablement par l'acide osmique (*Zachariadès*). Cette méthode est une méthode générale qui a permis de démontrer la véritable structure des cellules osseuses.

chromo-osmique ou bichromate-formol une cornée de grenouille, de pigeon ou de bœuf, l'inclure dans la celloïdine et y pratiquer des coupes perpendiculaires et tangentielles qu'on colorera par l'hématoxyline au fer.

Comme les imprégnations positives d'or et d'argent, les réseaux cellulaires colorés que l'on voit sur les coupes tangentielles correspondent exactement à l'image laissée en clair dans les imprégnations négatives d'argent. Les cellules conjonctives de la cornée remplissent donc exactement les interstices que leur laissent les lames et les faisceaux ; il n'y a pas de canaux du suc; les cellules migratrices ne cheminent donc pas dans des canaux préformés. En choisissant d'autres objets, dans lesquels le tissu conjonctif est formé de faisceaux et de fibrilles cheminant dans toutes les directions, en observant à l'état vivant le mésentère de grenouille, par exemple, détaché comme la cornée et placé dans une goutte de lymphe péritonéale, il sera facile de se convaincre que les cellules migratrices cheminent librement dans l'épaisseur du tissu conjonctif.

A l'état normal, la cornée de la grenouille, comme celle des autres animaux, ne contient qu'un petit nombre de cellules migratrices. Mais il est facile de les faire apparaître en grand nombre : on cautérise le centre de la cornée d'une grenouille neuve avec un crayon de nitrate d'argent. Le lendemain, on constate que la cornée est devenue trouble. L'humeur aqueuse, recueillie par ponction, est trouble et contient un grand nombre de leucocytes animés de mouvements actifs. La cornée est examinée dans une goutte d'humeur aqueuse (1); on observe dans son épaisseur un nombre inusité de cellules migratrices ayant des mouvements très actifs; un certain nombre d'entre elles contiennent dans leur protoplasma des granulations graisseuses brillantes.

L'aspect des cellules migratrices, l'identité de leurs mouvements avec ceux des globules blancs du sang ne laissent aucun doute sur leur nature : ce sont des leucocytes. Mais la cornée ne possède pas de vaisseaux (2); il faut donc admettre que les leucocytes venus des vaisseaux ont pénétré, à la périphérie de la membrane, entre les lames conjonctives. On introduit dans le sac lymphatique dorsal d'une grenouille, par une petite ouverture, un fragment de cornée enlevé à une autre grenouille; au bout de quelques jours, la périphérie du fragment est envahie dans toute son épaisseur, d'une quantité de cellules migratrices extraordinaire. Il en est de même si le fragment de cornée, avant d'être introduit, a macéré dans l'eau ou a été desséché, ou soumis à l'action de la chaleur de façon à tuer les cellules et à exclure toute participation des cellules fixes au phénomène : dans toutes ces conditions, le fragment retiré est envahi par de nombreux leucocytes qui, évidemment, viennent du sac lymphatique. Enfin, on introduit en même temps dans le sac lymphatique une cornée de grenouille et quelques gouttes d'une suspension de vermillon. La cornée retirée au bout de quelques jours est limitée par un liséré rouge; on trouve, dans son épaisseur, et surtout dans les parties périphériques, un grand nombre de cellules migratrices contenant des grains de cinabre. On ne voit pas de grains libres ; tous sont incorporés.

(1) On peut prendre l'humeur aqueuse d'une autre grenouille, saine, afin de n'être pas gêné par la présence des cellules lymphatiques dans l'humeur aqueuse enflammée.

(2) Chez les embryons de mammifère, il existe, dans les couches superficielles de la cornée, un réseau capillaire complet. Ce réseau s'atrophie peu après la naissance et il n'en reste, au pourtour de la membrane, que des anses vasculaires qui s'avancent plus ou moins dans son intérieur; chez quelques poissons osseux, chez la carpe notamment, la cornée reste vascularisée pendant toute la vie (Ranvier).

Mais l'expérience cruciale a été imaginée par *Cohnheim* (1) : on injecte, à l'aide d'une seringue, dans le sac lymphatique dorsal d'une grenouille, quelques gouttes d'une suspension très fine de bleu d'aniline insoluble dans l'eau (voir ch. v) On répète plusieurs jours de suite la même opération afin qu'un grand nombre de cellules lymphatiques se chargent de grains bleus. Puis, on cautérise la cornée de la grenouille en un point limité avec l'extrémité d'un crayon de nitrate d'argent. On sacrifie l'animal au bout de 2 ou 3 jours et on examine la cornée vivante; parmi les cellules migratrices qu'elle contient, un certain nombre montrent des grains bleus dans leur cytoplasme.

Ces expériences démontrent donc que les leucocytes du sang peuvent, après leur sortie des vaisseaux, voyager dans l'intérieur du tissu conjonctif. Mais elles ne démontrent pas, et il n'est pas sûr *a priori*, que toutes les cellules migratrices viennent du sang. Nous examinerons un peu plus loin cette question.

L'observation de la cornée vivante de la grenouille permet de constater qu'il existe des cellules migratrices mobiles dans l'épithélium antérieur; elles sont faciles à distinguer des cellules épithéliales, polygonales. En prenant comme objet d'étude la cornée du triton crêté ou de l'axolotl, on pourra parfois suivre le passage d'une cellule migratrice vivante du stroma cornéen dans l'épithélium antérieur. La lame basale antérieure de la cornée, la membrane de Bowman, lorsqu'elle est mince, peut donc être traversée par les cellules migratrices (2).

Les cellules migratrices contenues dans l'épithélium se reconnaissent sur les coupes transversales faites après inclusion à la celloïdine et colorées par les couleurs nucléaires. Les cornées irritées à l'avance par une cautérisation au nitrate d'argent, sont particulièrement favorables à cette observation ; les leucocytes migrateurs se reconnaissent à leur noyau polymorphe. Sur les coupes de la cornée imprégnées par l'or, les cellules migratrices intra-épithéliales sont vivement colorées en violet, ce qui les a fait prendre autrefois à tort pour des cellules nerveuses ; nous savons du reste, depuis les observations de *Cohnheim* et de *Ranvier*, que les nerfs se terminent dans l'épaisseur de l'épithélium par des boutons.

La cornée n'est pas le seul objet où les cellules migratrices peuvent être observées à l'état vivant. Toutes les membranes conjonctives minces et transparentes permettent de suivre leurs mouvements et leurs déplacements ; le mésentère de la grenouille, la membrane périœsophagienne de la grenouille, l'aponévrose fémorale du même animal sont de bons objets ; chez les Mammifères, le mésentère du rat, l'épiploon du lapin peuvent être aussi utilisés. Ces membranes seront examinées dans les mêmes conditions que la cornée (3).

(1) Cohnheim, *Virchow's Archiv*, t. LX, 1867.

(2) Cette observation est importante, car la membrane basale antérieure a une structure homogène. Chez l'homme et chez les espèces dans lesquelles la membrane de Bowman est épaisse, les cellules lymphatiques ne la traversent pas et paraissent incapables de la perforer ; il est probable qu'elles arrivent dans l'épithélium antérieur soit par le bord de la cornée, au niveau du repli conjonctival, soit en passant dans les canaux par lesquels les nerfs vont du stroma cornéen dans l'épithélium antérieur (voir Ranvier, *Leçons sur la cornée*, p. 322).

(3) Voir pour la technique ch. I et Ranvier, *l. c.* L'aponévrose fémorale de la grenouille verte forme pour cette étude un passage entre la cornée et les autres membranes, car dans cette aponévrose, les faisceaux conjonctifs sont disposés comme dans la cornée. On peut observer les cellules migratrices vivantes dans la cornée des mammifères en examinant dans l'humeur aqueuse des coupes tangentielles faites sur la cornée fraîche de chien ou de bœuf, ou en s'adressant à la cornée de petits animaux, souris, jeunes rats, etc.

Variétés de cellules contenues dans le tissu conjonctif. — La constitution du tissu conjonctif n'est pas partout aussi simple que dans la cornée. En beaucoup de points, le tissu conjonctif contient, en plus des cellules fixes et des cellules migratrices habituelles, des éléments arrondis, libres, dont les relations avec les leucocytes ont besoin d'être étudiées avec quelque précision.

Les différents aspects du tissu conjonctif diffèrent surtout par la manière dont faisceaux fibrillés et cellules sont associés, et aussi par les substances différentes qui imprègnent le plasma interstitiel. L'histogénèse, comme l'expérimentation et l'histopathologie, montre que le tissu tendineux, le tissu adipeux, le cartilage, l'os, ne sont que des formes spéciales de tissu conjonctif, simplement plus différenciées, adaptées plus particulièrement à des fonctions spéciales. Ces tissus appartiennent à la même famille : ce sont *les tissus de substance conjonctive*. Cette relation est importante à connaître ; c'est elle qui, lorsque nous étudierons l'histogénèse du sang, nous permettra de comprendre que le tissu lymphoïde, et, d'une manière générale, tous les tissus qui fabriquent le sang, ne sont qu'un des aspects, qu'une des adaptations fonctionnelles du tissu conjonctif.

Fig. 208. — Rat. Tissu conjonctif sous-cutané. Boule d'œdème produite avec une solution de rouge neutre dans l'eau salée.

M, *M*, mastzelles ; — *R*, cellules de Ranvier (clasmatocytes des mammifères, cellules rhagiocrines) ; — *C*, cellule conjonctive ; — *F*, faisceau conjonctif. 520 diam.

Observation du tissu conjonctif. — Pour prendre une idée de la structure du tissu conjonctif lâche, on pourra d'abord pratiquer dans le tissu sous-cutané de la cuisse d'un mammifère, une boule d'œdème, en injectant, suivant la méthode de Ranvier, une solution d'acide osmique à 1 p. 100. Avec de fins ciseaux, on résèque un fragment de la boule d'œdème ainsi produite et on l'examine entre lame et lamelle, dans une solution aqueuse de violet de méthyle 5 B.

On complétera les renseignements obtenus par la méthode précédente en injectant dans le tissu conjonctif lâche une solution de rouge neutre dans l'eau salée à 8 p. 1.000. On choisit un cobaye ou un rat blanc ; on incise la peau du ventre, on l'écarte et on pique l'aiguille dans la mince couche de tissu conjonctif lamelleux qui recouvre les muscles ; on injecte quelques gouttes de la solution de rouge neutre, de façon à produire une boule d'œdème ; on en résèque un fragment qu'on examine entre lame et lamelle ; cette dernière doit reposer sur une cale en papier ou en paraffine ; la préparation est lutée à la paraffine et examinée.

Ce qui frappe tout d'abord, surtout s'il s'agit du rat, c'est la présence de volumineuses cellules irrégulièrement arrondies, et remplies par des granulations colorées en rouge. Le noyau apparaît comme une tache claire, ronde. Chez le cobaye, elles ont le même aspect, mais elles sont moins grosses et moins nombreuses, de forme plus irrégulière; leur noyau est ovalaire et un peu plus gros par rapport à la cellule, leurs granulations plus fines et moins serrées. Ces éléments correspondent aux *cellules d'Ehrlich* ou « *mastzelles* ». En dehors d'eux, on aperçoit de gros noyaux ovalaires, vésiculeux, transparents, incolores ou colorés d'une manière très pâle; ce sont les noyaux des cellules conjonctives dont le corps cytoplasmique, peu coloré, apparaît mince et lamelleux avec des prolongements larges dont on distingue mal les limites. D'autres cellules ont une forme allongée, très irrégulièrement fusiforme; leur noyau est petit, allongé, ovalaire ou réniforme. Les deux prolongements cellulaires sont moniliformes et terminés par des extrémités arrondies. Ils sont rarement ramifiés, et jamais anastomosées avec ceux des cellules voisines. Ces éléments correspondent aux cellules décrites par *Ranvier*, *chez les mammifères*, sous le nom de *clasmatocytes*. Leur protoplasma contient des grains de différente grosseur colorés par le rouge neutre, disséminés et jamais nombreux et pressés comme dans les cellules d'Ehrlich. Enfin, on rencontre, de place en place, des éléments plus petits, arrondis, à granulations réfringentes non colorées par le rouge et qui correspondent à des leucocytes granuleux semblables aux leucocytes éosinophiles du sang. L'observation donne à peu près les mêmes résultats chez le chien et le chat; chez le lapin, au contraire, on n'aperçoit pas de cellules d'Ehrlich.

Les préparations faites de cette façon ne se conservent pas; elles s'altèrent rapidement; de plus, beaucoup de faits échappent à l'observation. Pour obtenir des préparations persistantes, il faut procéder autrement. On fixe sur un bouchon de liège, dans son état d'extension physiologique, avec quatre épingles ou quatre piquants de hérisson, un fragment de la paroi musculaire abdominale d'un rat. Après fixation pendant quelques heures par un mélange bichromate-sublimé-formol (voir ch. I) (1) et inclusion dans la paraffine ou mieux dans la celloïdine, on pratique des coupes tangentielles qui intéressent la couche conjonctive intermédiaire aux deux couches musculaires (2). Ces coupes seront colorées à la toluidine ou au bleu de méthylène, suivant les méthodes que nous avons décrites (ch. I). Le tissu conjonctif cutané (corps papillaire et pannicule sous-dermique), sur des coupes perpendiculaires de la peau, est aussi un excellent objet (3).

On s'adressera aussi aux *membranes* minces (mésentère, épiploon) qui sont des objets très favorables. Le mésentère est souvent trop chargé de graisse. L'épi-

(1) On utilisera aussi la fixation par l'alcool absolu après lequel certaines réactions colorantes donnent de bons résultats. Les mélanges acétifiés ne conviennent pas, car ils altèrent beaucoup de granulations cytoplasmiques; il en est de même de la plupart des mélanges à base d'acide picrique. Les mélanges chromo-osmiques sont excellents, mais ils ne conviennent qu'à certaines colorations (hématoxyline au fer, safranine-gentiane-orange, etc.).

(2) Cette méthode convient pour les petits mammifères (rat, souris, cobaye). Pour les animaux plus gros, on dédouble la paroi abdominale (voir Maximoff, *Archiv f. mikr. Anatomie*, LXVII, 1906, et Rubens-Duval, Th. Paris, 1908).

(3) Voir Darier, *Histologie de la peau* in *Pratique dermatologique*. Chez l'homme, les interventions chirurgicales, les amputations, les biopsies cutanées faites pour le diagnostic, donnent souvent l'occasion d'étudier, dans d'excellentes conditions, les cellules libres du tissu conjonctif.

ploon du cobaye est large, mais il est trop réticulé, de même que celui du chien. L'épiploon du rat, peu réticulé est un excellent objet, surtout pour l'observation des cellules d'Ehrlich.

L'épiploon du lapin est très favorable, parce qu'il offre de larges étendues non chargées de graisse, et qu'il est percé seulement de quelques trous. Mais les cellules d'Erhlich y sont d'une extrême rareté. Pour comprendre la structure de cette membrane, on observera d'abord l'endothélium qui recouvre ses deux faces sur des préparations dont les limites cellulaires ont été marquées par l'imprégnation d'argent.

La fixation et la coloration de ces membranes seront pratiquées comme nous l'avons déjà indiqué (ch. I). L'alcool fort, les mélanges de Helly et de Dominici seront surtout employés ; la fixation est facilement réalisée en 30 minutes ; on choisira de préférence les colorations à base de toluidine et de bleu de méthylène (1).

Chez les Batraciens, les membranes minces (périœsophagienne, rétro-péritonéale, rétro-linguale, mésentère de la grenouille, etc.) seront étudiées de la même façon.

Cellules conjonctives. — Les *cellules conjonctives* proprement dites se distinguent par leur forme, irrégulièrement arborisée. Leur noyau est grand, en général ovalaire ; la chromatine, peu abondante, est réduite à quelques granules centraux (2). Le corps protoplasmique est aplati dans le plan de la couche conjonctive ; il est ordinairement peu coloré ; les prolongements souvent massifs, en forme d'ailerons, à limites peu distinctes, sont anastomosés avec ceux des cellules voisines (3) ; le protoplasma est homogène, mais il peut contenir parfois quelques granulations colorables par le rouge neutre. La forme lamelleuse de ces éléments explique qu'ils soient peu visibles sur les coupes perpendiculaires ; c'est ce qu'on remarque sur les coupes du derme tandis qu'on les voit bien sur les coupes tangentielles des espaces intermusculaires, ou dans les membranes étalées (4).

(1) Voir ch. I. On utilisera aussi avec profit, pour comparaison, la méthode de Ranvier qui consiste à fixer la membrane 2 à 5 minutes dans une solution osmique à 1 p. 100 et à colorer avec une solution aqueuse de violet 5 B ; on monte dans l'eau glycérinée.

(2) Quelquefois il n'y a qu'un ou deux granules centraux, plus gros, que colorent les couleurs acides ou qui prennent, avec la toluidine, une teinte métachromatique. Il s'agit alors d'un *nucléole* véritable, distinct des granulations chromatiques habituelles du noyau, et formé d'une chromatine différenciée. Ce nucléole apparaît souvent dans les cellules conjonctives et endothéliales au cours de l'inflammation.

(3) Aussi l'ensemble de ces cellules a-t-il été considéré parfois comme un syncytium. Suivant les espèces animales, les prolongements sont fins, ou lamelleux et largement anastomosés. Ces différences ont d'abord été nettement constatées dans la cornée où l'on a distingué un type corpusculaire (grenouille) et un type lamelleux (rat).

(4) Dans les membranes séreuses des Mammifères, ces cellules sont peu nombreuses ; c'est qu'ici, la plupart des cellules conjonctives fixes anastomotiques ont pris, par l'adaptation fonctionnelle, un aspect spécial : elles sont aplaties, juxtaposées et forment un endothélium de revêtement.

En raison des relations génétiques qu'elles ont avec les fibrilles conjonctives, ces cellules ont été quelquefois appelées *fibroblastes* (1). Dans certains cas, elles se présentent sous la forme de masses lamelleuses homogènes, à limites peu distinctes et contenant plusieurs noyaux ovalaires. Cet état plasmodial de la cellule conjonctive (2) provient en général de la fusion d'éléments contigus et n'est qu'un aspect plus accentué de la fusion anastomotique (3). On le voit surtout dans l'inflammation, à la suite de l'irritation des éléments conjonctifs, mais il peut exister déjà à l'état normal. Aux dépens de ces masses plasmodiales peuvent se former de nouveau, par fragmentation, des cellules conjonctives distinctes. La formation de ces plasmodes, lorsqu'ils perdent leurs connexions anastomotiques, exprime alors le plus souvent une régression (4).

Le protoplasma de la cellule conjonctive fixe est en général à peu près homogène. Lorsqu'il est irrité, de nombreuses vacuoles y apparaissent ; il prend un aspect spongieux et se colore beaucoup plus vivement. Dans cet état d'irritation, la cellule conjonctive acquiert, comme nous le verrons plus loin, un pouvoir phagocytaire considérable.

La *cellule endothéliale* n'est qu'une adaptation fonctionnelle de la cellule conjonctive. On peut, avec *Ranvier*, considérer ces cellules comme anastomosées étroitement et presque confondues dans leur partie profonde tandis que leur portion superficielle, excessivement mince, forme un plateau, séparé du plateau des cellules voisines par des interstices minces remplis d'un ciment intercellulaire où l'argent se réduit quand on pratique des imprégnations. L'étude des membranes séreuses enflammées justifie absolument cette manière de voir (5).

Les *cellules adipeuses* représentent également une différenciation fonctionnelle de la cellule conjonctive. Elles sont nombreuses dans les membranes ; elles sont globuleuses, souvent aplaties, remplies par un globule de graisse ordinairement unique ; il est coloré

(1) Voir ch. XI. Certains auteurs réservent le nom de fibroblastes à celles dont le protoplasma a presque entièrement été utilisé à la formation du faisceau conjonctif (tendon, derme, hypoderme).

(2) Dominici, *Archives d'anat. microscopique*, 1920 et 1921. Rubens-Duval, Th. Paris, 1908.

(3) La mitose n'intervient guère pour expliquer ces formations ; la division directe des noyaux y prend peu part.

(4) La plasmodie du follicule tuberculeux et celles qui se forment au voisinage des corps étrangers représentent un état avancé de cette régression. *Dominici* a considéré les plasmodes conjonctifs qu'on observe à l'état normal comme destinés à essaimer, dans certaines conditions irritatives, des cellules migratrices d'origine conjonctive.

(5) Voyez plus loin. Les cellules endothéliales vasculaires ont la même disposition.

en noir par l'acide osmique. Avec la plupart des techniques usuelles, le globule de graisse a été dissous ; mais il est reconnaissable à la place vide qu'il occupait. Le noyau, très petit, est situé à la périphérie, dans une mince lame de protoplasma qui, à la surface du globule de graisse, forme comme une sorte de membrane. D'autres cellules conjonctives peuvent prendre la forme globuleuse par suite d'une adaptation fonctionnelle spéciale : il en est ainsi, par exemple, des cellules du tendon sésamoïde de la grenouille, des cellules interstitielles du testicule, etc. (1).

Cellules d'Ehrlich. — En 1877, *Ehrlich* (2), appliquant les couleurs d'aniline à l'étude du tissu conjonctif, distingua, parmi les cellules granuleuses disparates décrites par *Waldeyer* sous le nom de cellules plasmatiques, des éléments qui se coloraient vivement par les violets de méthyle, et dont les granulations protoplasmiques prenaient, avec ces substances, une teinte rougeâtre métachromatique. Il crut les voir surtout abondantes dans le tissu conjonctif enflammé chroniquement, gorgé de suc, et il leur donna pour cette raison le nom de « mastzellen ». Un peu plus tard, il reconnut dans le sang l'existence de leucocytes granuleux dont les granulations avaient la même affinité pour les couleurs d'aniline basiques ; il les assimila aux cellules granuleuses qu'il avait décrites dans le tissu conjonctif. Le plus souvent, il existe des différences entre les unes et les autres et il y a intérêt à distinguer, d'une part, les cellules granuleuses à granulations basophiles du tissu conjonctif (3), et, d'autre part, les leucocytes du sang qui portent des granulations ayant des réactions analogues (4). Nous réserverons aux premières le nom de cellules d'Ehrlich ; ce sont les seules que nous décrirons ici.

C'est chez le rat et la souris que ces cellules sont le plus facile à voir. Elles sont grosses, globuleuses, à contours irrégulièrement arrondis. Le protoplasma est rempli de grosses granulations, nombreuses, qui prennent vivement le rouge neutre et le bleu de méthylène dans les colorations vitales et qui, dans les préparations fixées et colorées par les bleus basiques sont violacées ou rougeâtres. Le noyau est petit, arrondi. On trouve souvent ces cellules accumulées en grand

(1) Pour les mitochondries des cellules conjonctives et des cellules adipeuses, voir Dubreuil, *Archives d'anatomie microscopique*, XV, 1913.

(2) Ehrlich, *Archiv f. mikr. Anatomie*, XIII, 1877.

(3) Cellules d'Ehrlich ; mastzelles ; mastzelles histiogènes ; cellules à granulations γ ; cellules isoplastiques ; labrocytes, mastocytes.

(4) Leucocytes à granulations basophiles, à granulations γ ; mastzelles hématogènes ; mastleucocytes.

nombre dans les portions vascularisées de l'épiploon, au milieu des cellules adipeuses.

Chez le cobaye, les cellules d'Ehrlich sont moins nombreuses ; leurs contours sont plus irréguliers ; elles sont souvent allongées, surtout contre les vaisseaux. Chez l'homme et chez le cobaye, elles ont des granulations plus fines que celles du rat ; elles sont irrégulièrement fusiformes, avec des extrémités renflées en massue, souvent étirées le long des vaisseaux ou des faisceaux conjonctifs, avec un noyau petit, irrégulièrement ovalaire. Elles ont à peu près les mêmes caractères chez le chien, le chat, le cheval, le porc, etc. (1). Chez le lapin, elles sont extrêmement rares, petites, et passent souvent inaperçues (2).

Ces cellules sont répandues partout ; elles existent à l'état normal dans le derme, les membranes, dans le tissu conjonctif des viscères et des organes hémopoiétiques.

On peut observer d'une espèce à l'autre, quelques différences dans les réactions des grains. Chez le rat, ces grains ont une affinité énergique pour toutes les couleurs nucléaires, y compris l'hématoxyline. La métachromasie avec les violets et bleus basiques est particulièrement accusée (3).

Dans le tissu conjonctif des Oiseaux et des Reptiles, on trouve aussi de pareilles cellules ; elles sont en général petites, à granulations fines. Chez les Batraciens, elles sont nombreuses, volumineuses, et peuvent prendre des formes ramifiées (clasmatocytes).

Nature des cellules d'Ehrlich. — La nature des granulations des cellules d'Ehrlich n'est pas connue. Ces granulations sont solubles dans l'alcool faible, très sensibles aux acides. Elles n'ont pas les réactions des graisses. Leurs réactions colorantes les a fait rapprocher de la mucine et de l'amyloïde ; mais cette assimilation n'est pas certaine (4). L'origine nucléaire de ces grains, quelquefois mise en avant, est fort problématique. On les a rapprochés des grains de sécrétion basophiles des Protistes connus sous le nom de corpuscules métachromatiques ou grains de volutine et qui sont considérés comme des produits de réserve (5). C'est aussi l'opinion qui a été émise le plus souvent au sujet des grains des matzelles. *Ehrlich* avait observé leur abondance dans les points où le tissu conjonctif

(1) Maximoff, *l. c.* — Sabrazès et Lafon, *Folia h.*, VI, 1908. — Du Bois, *An. Anzeiger*, XXV, 1904. — Westphal, *in Farben analytische* d'Ehrlich. — Levaditi, Th. Paris, 1902.

(2) Par contre, les leucocytes à granulations basophiles sont assez nombreux dans le sang du lapin.

(3) Les mastzelles sont colorées par la plupart des colorants basiques d'aniline bleus et violets. Elles prennent la safranine et se colorent en violacé par le vert de méthyle. L'hématoxyline et l'hématéine ne les colorent que dans certaines conditions.

(4) Nordmann, *Int. Monatschr. f. Anat. u. Histologie*, II, 1885.

(5) Guilliermond et Mawas, *S. de Biologie*, 22 février 1908.

était œdématié ou congestionné chroniquement, et il pensait que leur présence était liée à des conditions particulières de nutrition du tissu conjonctif (1). Plus tard, d'autres observateurs les virent augmenter de nombre chez la grenouille par une alimentation abondante à la suite d'une longue période de jeûne (2). Mais ces observations n'ont pas été confirmées. D'une part, les mastzelles sont aussi nombreuses dans le tissu conjonctif des malades morts de cachexie que chez les individus morts en bon état de nutrition (3). Elles ne semblent pas non plus disparaître ou diminuer à la suite du jeûne. Chez la chauve-souris, *Ballowitz* (4) n'a trouvé aucune différence dans les examens comparatifs faits chez ces hibernants, en automne, où ces animaux sont gras et au moment du réveil printanier, alors qu'ils sont amaigris par plusieurs mois de jeûne.

On peut faire des constatations analogues chez la grenouille. Il n'existe pas aujourd'hui d'expériences décisives permettant d'attribuer à ces cellules un rôle direct dans la nutrition. La dissémination des grains est en général une apparence due à ce que le protoplasma qui les contient n'est pas coloré. Quant au halo rouge qu'on voit souvent autour de ces cellules, dans les préparations colorées avec un bleu basique, il est avant tout l'expression d'une fixation imparfaite ; ce halo rouge ne se produit pas lorsque le tissu a été bien fixé ; c'est un cercle de diffusion dû à la solubilité des grains dans les solutions (5).

Ranvier, d'après ses observations sur les membranes et sur la sérosité péritonéale (6), avait considéré ces cellules comme immobiles. Quelques auteurs ont cependant admis leur mobilité à cause de la forme allongée et irrégulière qu'elles prennent souvent, surtout au voisinage des vaisseaux. D'après mes observations *in vitro*, ces mouvements existent, mais ils sont excessivement lents, avec de longues périodes de repos, et sans comparaison possible avec les mouvements amiboïdes des leucocytes.

Les formes de passage entre des cellules non granuleuses et des mastzelles peuvent se voir chez de jeunes animaux, en particulier dans l'épiploon du rat. Les mitoses de ces cellules sont exceptionnelles (7). Les cellules d'Ehrlich paraissent donc former dans le tissu conjonctif une catégorie de cellules bien définie. Malgré les réactions analogues de leurs granulations, on doit les distinguer aussi des leucocytes à granulations basophiles (mastzelles leucocytes), dont la taille est plus petite, le noyau polymorphe, les grains quelquefois plus fins et qui ont parfois, comme chez le cobaye, des caractères distinctifs (8). Ces leucocytes peuvent arriver dans le tissu conjonctif, par diapédèse ; on les voit alors à côté des véritables mastzelles. Ils y sont en général exceptionnels, en particulier chez l'homme, le rat, la souris, dont les cellules d'Ehrlich sont au contraire bien caractérisées et faciles à voir (9).

(1) Ehrlich, *Arch. f. Anat. u. Phys. Phys. Abt.*, 1879, et *Farbenanalytische Untersuchungen*, I.

(2) Korybutt-Daczkiewicz, *Archiv f. mikr. An.*, XV, 1878. — Stassano et Haas, *S. de Biologie*, 4 août 1900.

(3) Westphal, *In. Diss.*, 1880, *in Farbenanalytische Unt.*, I.

(4) Ballowitz, *An. Anzeiger*, VI, 1891.

(5) Jolly, *C. R. de l'Ass. des anatomistes*, 3e session, Lyon, 1901.

(6) Ranvier, *C. R. de l'Acad. des sciences*, 14 avril 1890.

(7) Maximoff, *Ziegler's Beiträge zur path. Anatomie*, XXXIX, 1906.

(8) Jolly, *Archives d'anatomie microscopique*, III, mars 1900. Levaditi, Th. Paris, 1902.

(9) Chez le lapin, les véritables mastzelles sont rarissimes dans le tissu conjonctif tandis que les leucocytes à granulations basophiles sont relativement nombreux dans le

Formes arborisées des cellules d'Ehrlich chez les Batraciens. Clasmatocytes de Ranvier. — Chez les Oiseaux et les Reptiles, il existe des cellules granuleuses ayant les caractères et les réactions des cellules d'Ehrlich. Elles sont en général peu nombreuses et, chez les Oiseaux surtout, petites, irrégulièrement globuleuses ou allongées contre les vaisseaux. Chez les Batraciens, elles acquièrent au con-

Fig. 209. — Membrane périœsophagienne de la grenouille verte fixée par un mélange chromo-osmique et colorée par la thionine.

C, C, clasmatocytes; — *M*, mastzelles dont les clasmatocytes ne sont qu'un des aspects; — *Vs*, vaisseau sanguin contenant des hématies; — *E*, noyaux des cellules endothéliales. 120 diam.

traire un développement exceptionnel. Chez les Anoures comme chez les Urodèles, elles sont répandues partout dans le tissu conjonctif; mais c'est surtout en examinant les membranes qu'on reconnaît bien leur disposition arborisée et leur taille considérable qui, chez les Urodèles (triton, axolotl, salamandre), atteint des proportions gigantesques. Ce sont ces grandes cellules qui ont été décrites par *Ranvier* sous le nom de *clasmatocytes* (1).

Chez la grenouille, l'objet le plus favorable pour mettre en évidence les clasmatocytes est la membrane d'enveloppe du sac lymphatique périœsophagien (voir

sang. Les leucocytes à granulations basophiles métachromatiques, avec leurs formes mères de la moelle osseuse (myélocytes à granulations basophiles, à noyau arrondi, présentant des mitoses), paraissent donc, au moins chez les Mammifères, des cellules distinctes des mastzelles véritables, appartenant au tissu conjonctif (voir Maximoff, *Archiv f. mikr. Anatomie*, LXXXIII, 1913).

(1) Ranvier, *C. R. de l'Ac. des sciences*, 27 janvier 1890, et *Archives d'anatomie micr.*, III, mars 1900.

ch. I). On injecte dans le sac une solution d'acide osmique à 1 p. 100, et au bout de 2 ou 3 minutes, on sectionne l'œsophage, on détache la membrane dans l'eau distillée, on l'étend sur lame, on recouvre avec quelques gouttes d'une solution aqueuse de violet 5 B, on fait passer sous le bord de la lamelle un peu de glycérine et on observe au microscope. On aperçoit immédiatement les clasmatocytes qui ont pris le violet d'une manière intense. Leur forme est irrégulière, légèrement arborisée; ils ne s'anastomosent pas. Dans le mésentère du triton fixé par l'acide osmique et coloré par le violet de méthyle (1), les cellules montrent des prolongements considérables et arborisés ; malgré leurs ramifications, ces prolongements ne s'anastomosent jamais. Comme chez la grenouille, leur protoplasma est granuleux et leurs extrémités, moniliformes, apparaissent souvent fragmentées, d'où le nom que leur a donné *Ranvier* (2).

Fig. 210. — Mésentère du triton crêté ; clasmatocyte. Coloration au violet 5 B. D'après Ranvier.

Lorsqu'on examine ces cellules à l'état vivant, on reconnaît qu'elles sont immobiles (3) ; elles ne ressemblent en rien à ce sujet aux cellules migratrices de la cornée (4).

Si on applique maintenant à la membrane périœsophagienne de la grenouille et au mésentère du triton, les méthodes de coloration régressive par les couleurs d'aniline basiques (toluidine, thionine, etc.), on s'aperçoit que le protoplasma des clasmatocytes est rempli de granulations colorées en rouge qui ont les mêmes réactions que celles des mastzelles. De plus, on trouve, les unes à côté des autres, des formes massives, petites, et des formes arborisées, qui ont toutes les mêmes réactions.

(1) Il faut épingler une anse intestinale pendant la fixation parce que le mésentère du triton contient des fibres musculaires lisses qui gênent l'extension de cette membrane.

(2) Ranvier pensait que les fragments servaient à la nutrition du tissu environnant. La clasmatose de ces cellules, telle que l'entendait Ranvier, n'est pas certaine ; les portions séparées sont peut-être unies par un protoplasma hyalin, incolorable. Il existe une clasmatose certaine des *leucocytes;* nous en avons parlé plus haut ; mais elle se produit autrement.

(3) L'expérience peut être faite avec la membrane périœsophagienne qu'on recueille, fraîche, avec précaution, sur une grenouille verte dont on vient de détruire la moelle épinière pour l'immobiliser. La membrane est étendue, sans aucune traction, sur lame ; on recouvre d'une goutte de lymphe recueillie à l'avance dans le péritoine ou dans le sac péricardique et on recouvre d'une lamelle soutenue par une cale de paraffine.

(4) De cette immobilité, Ranvier avait conclu que ces cellules étaient des leucocytes migrateurs immobilisés secondairement dans le tissu conjonctif. La substance granuleuse qu'elles élaboraient était pour lui, une substance albuminoïde de réserve qu'elles pouvaient, suivant les besoins, rendre aux tissus et qu'elles accumulaient, comme les cellules adipeuses accumulent la graisse.

La forme arborisée des clasmatocytes des Batraciens est donc, en résumé, l'aspect morphologique sous lequel se présentent le plus souvent les cellules d'Ehrlich dans le tissu conjonctif de ces animaux (1). Il n'en est plus de même chez les Mammifères, où les cellules décrites par Ranvier sous le même nom sont distinctes des mastzelles (2).

Clasmatocytes des Mammifères. Cellules migratrices immobilisées. — Si on examine l'épiploon d'un mammifère (homme, lapin, cobaye, rat, chien) traité par la méthode de Ranvier (3), on aperçoit des cellules qui, par leur coloration violet foncé tranchent sur le fond plus clair de la membrane : ce sont des éléments allongés, irrégulièrement fusiformes, dont les prolongements, moniliformes, très rarement ramifiés, quelquefois fort longs, sont terminés par des extrémités arrondies ou renflées et ne s'anastomosent jamais. La partie centrale de la cellule contient le noyau, irrégulièrement ovalaire et allongé et qui tranche en clair sur le protoplasma, coloré uniformément en violet.

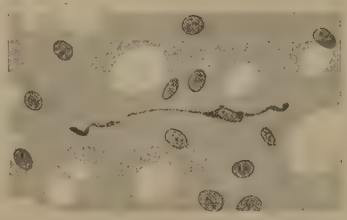


Fig. 211. — Enfant de 3 ans. Épiploon. Acide osmique. Violet 5 B. Clasmatocyte de Ranvier.

Ces cellules sont répandues partout. Leur vague ressemblance de forme avec les clasmatocytes des Batraciens avait fait croire à *Ranvier* qu'il s'agissait là des mêmes éléments. Mais si on traite l'épiploon des Mammifères par les méthodes de coloration régressive par les bleus basiques, on constate que ces cellules n'ont pas les caractères des mastzelles. Avec les colorations vitales, avec le rouge neutre dissous dans l'eau salée isotonique, on constate, autour du noyau, un petit nombre de grains colorés par le rouge ; ces granulations, après fixation, peuvent se colorer en violet rougeâtre par les bleus basiques ; mais elles sont peu nombreuses ; ces cellules forment une catégorie distincte.

Fig. 212. — Tissu conjonctif sous-cutané du rat. Boule d'œdème obtenue par l'injection d'une solution de rouge neutre dans l'eau salée. Clasmatocyte de Ranvier, montrant des grains colorés par le rouge neutre. 665 diam.

1 Jolly, *S. de Biologie*, 3 juin 1900, et *C. R. de l'Ass. des Anatomistes*, Lyon, 1901.

(2) D'après les recherches de *Dantschakoff*, de *Maximoff* et de *Weidenreich*, les leucocytes à granulations basophiles du sang, chez les Vertébrés inférieurs, seraient capables d'émigrer et de se transformer dans le tissu conjonctif, en véritables mastzelles, donc en clasmatocytes. Cette question ne me semble pas encore résolue.

(3) Fixation par l'acide osmique, coloration par une solution aqueuse de violet 5 B, conservation dans l'eau glycérinée.

La fragmentation ou clasmatose du protoplasma de ces éléments est parfois visible ; mais le phénomème est beaucoup moins apparent qu'au niveau des clasmatocytes des Batraciens (1).

Ranvier les a considérés comme des cellules migratrices immobilisées et c'est la manière de voir qui a été généralement acceptée ; ils seraient formés par des lymphocytes venus du sang. D'autres auteurs les considèrent comme des cellules conjonctives embryonnaires formées sur place pendant le développement. Ces deux modes de formation paraissent possibles. C'est là un point encore en discussion (2).

Cellules rhagiocrines. — *Renaut* (3) a décrit sous le nom de rhagiocrines des cellules que l'on trouve dans le tissu conjonctif, dans l'épiploon en particulier et dont le protoplasma porte des grains de sécrétion contenus dans des vacuoles et colorables par le rouge neutre en coloration vitale (4).

Renaut a considéré la présence de ces grains comme la preuve d'une fonction sécrétoire spéciale qui caractériserait les stades de développement allant du lymphocyte à la cellule conjonctive. La plupart des cellules rhagiocrines de Renaut semblent bien correspondre aux clasmatocytes des Mammifères, c'est-à-dire aux cellules de Ranvier. La propriété de se colorer en coloration vitale par le rouge neutre n'est pas particulière à ces cellules et elle appartient aussi aux cellules d'Ehrlich (*mastzelles*).

D'autres substances que le rouge neutre ont été employées pour colorer, en coloration vitale, les cellules contenues dans le tissu conjonctif et les membranes. En dehors des couleurs basiques, comme le bleu de méthylène, des substances appartenant au groupe de la benzidine (bleu trypan, bleu pyrrol) peuvent être injectées chez l'animal vivant, en solution dans l'eau salée isotonique, dans les veines, le tissu conjonctif ou la cavité péritonéale. Elles laissent en général incolores les granulations des leucocytes et colorent au contraire avec prédilection le protoplasma granuleux des mastzelles, des clasmatocytes, des cellules endothéliales et des cellules de Kupffer (5).

Cellules pigmentaires. — On rencontre encore, dans le tissu conjonctif, mais surtout chez les Vertébrés inférieurs, des cellules contenant des grains de

(1) La clasmatose est du reste un phénomène assez général ; on l'observe, surtout dans l'inflammation, au niveau des leucocytes polynucléaires, des cellules conjonctives, des masses plasmodiales, des cellules plasmatiques, etc. ; il existe tous les degrés entre la clasmatose, phénomène physiologique, et la clasmatose, phénomène régressif.

(2) Ranvier ne s'est pas prononcé sur les liens génétiques pouvant exister entre ces cellules et les cellules conjonctives, ou plutôt, il s'est toujours efforcé de distinguer nettement les deux sortes d'éléments Il est possible que les cellules de Ranvier puissent se transformer en cellules conjonctives véritables, mais le fait n'est pas démontré. D'après des travaux récents, il faudrait voir dans ces cellules le stade de passage entre un lymphocyte migrateur et une cellule conjonctive véritable (voir plus loin).

(3) Renaut, *Archives d'an. micr.*, IX, 1907. — Dubreuil, *Archives d'an. micr.*, XV, 1913.

(4) D'après la description de Renaut, ce sont les vacuoles contenant les grains, et non ces grains eux-mêmes, qui se colorent par le rouge neutre.

(5) Voir ch. I, Colorations vitales.

pigment mélanique, ne donnant pas les réactions du fer. Ces cellules pigmentaires, telles qu'on les voit, par exemple, dans les membranes des Batraciens et des Reptiles, se présentent sous forme d'éléments arborisés, non anastomosés ou peu anastomosés. Leur forme et leur aspect rappelle, dans certains cas, particulièrement chez les Urodèles (triton, salamandre, axolotl) les clasmatocytes-mastzelles (1). Ce sont des cellules conjonctives différenciées en vue d'une adaptation fonctionnelle nouvelle.

Cellules plasmatiques ou plasmocytes. — On réserve aujourd'hui ce nom (2) aux cellules décrites par *Unna* en 1891 dans la peau de l'homme présentant les lésions de l'inflammation chronique (3). Elles existent déjà dans le tissu conjonctif normal, mais elles y sont peu nombreuses. Dans la peau normale, elles sont exceptionnelles. Il est plus facile de les mettre en évidence dans les membranes péritonéales (4). Le grand épiploon est un objet favorable. On trouve les plasmazelles accolées à la paroi des capillaires. Ce sont des cellules dont la taille est variable mais atteint celle des plus gros lymphocytes. Elles sont presque toujours groupées. Leur forme est massive, globuleuse ou souvent vaguement polyédrique, par tassement réciproque. Le noyau, situé en général excentriquement, est toujours exactement arrondi; il est assez gros, riche en suc nucléaire; la disposition de la chromatine rappelle celle qu'on voit dans le noyau des lymphocytes, mais les grains chromatiques sont placés plus régulièrement (5). Le corps protoplasmique, comprimé surtout sur les côtés par la pression des cellules plasmatiques voisines, s'arrondit régulièrement du côté libre et s'aplatit du côté de la paroi vasculaire, sur laquelle on voit parfois une rangée de cellules s'appuyer à la manière d'un revêtement épithélial. Quand la cellule n'est pas comprimée, le corps cellulaire est sphérique ou ovoïde.

(1) Il est fort possible qu'il s'agisse d'éléments très voisins. Les grains de clasmatocytes-mastzelles pourraient dans ce cas être considérés comme un chromogène, comme un *pigment incolore*. Ces cellules conjonctives pigmentaires (chromatocytes, chromoblastes, etc.) existent aussi chez les Mammifères, mais elles y sont plus rares. Le pigment mélanique épidermique, celui qui colore la peau du nègre, se trouve dans l'intérieur des cellules épidermiques (voir ch IV).

(2) Le nom de cellule plasmatique a été autrefois appliqué par Virchow à la cellule conjonctive arborisée. Plus tard, en 1875, Waldeyer appliqua cette dénomination à des cellules à protoplasma granuleux qu'il trouvait dans le tissu conjonctif près des vaisseaux, et qui étaient, pour la plupart, nous le savons aujourd'hui, les cellules d'Ehrlich; mais, n'ayant pour les caractériser que leur aspect général, il réunissait, sous cette dénomination, des éléments très disparates.

(3) Unna, *Monatshefte f. praktische Dermatologie*, XII, 1891. *Histopathologie de la peau* et *Encyclopédie technique d'Erhlich*. — Darier, *Ann. de derm.*, 1895.

(4) Jolly, *S. de Biologie*, 22 décembre 1900, et *C. R. de l'Ass. des anatomistes*, Lyon, 1901.

(5) Dans le noyau des plasmocytes, comme dans celui des lymphocytes, Rubens-Duval (Th. Paris, 1908) colore, par l'éosine orange-bleu, après mordançage par l'alun de fer, un petit nucléole acidophile.

Le protoplasma ne contient pas de granulations réfringentes, mais son aspect est grenu (1). Il a une affinité spéciale pour les couleurs d'aniline basiques, particulièrement pour les bleus de méthylène et les violets de méthyle. En coloration régressive, il garde énergiquement le bleu de méthylène, la thionine, la toluidine, la fuchsine basique, la pyronine, etc. Le protoplasma paraît souvent plus coloré à la périphérie ; entre cette zone bien colorée et le noyau on voit souvent une tache claire qui correspond à la sphère attractive et dans laquelle on colore parfois un centrosome.

Fig. 213. — Chien. Grand épiploon. Coloration au bleu polychrome. Cellules plasmatiques, *P*, groupées autour d'un vaisseau sanguin *Vs*. 420 diam.

A l'état normal, chez l'homme, on peut trouver des plasmocytes dans l'épiploon et même dans le tissu conjonctif diffus, mais ils y sont rares, et pratiquement, leur apparition en nombre assez grand est toujours l'indice d'une réaction inflammatoire. Ces cellules ont à peu près les mêmes caractères dans l'épiploon du chien, du lapin, du cobaye, du rat et de la souris. On les trouve toujours à l'état normal, bien qu'en petit nombre, dans les organes hématopoiétiques. Mais on les a trouvées aussi dans un certain nombre d'organes qui n'ont aucun rapport avec la formation du sang. On

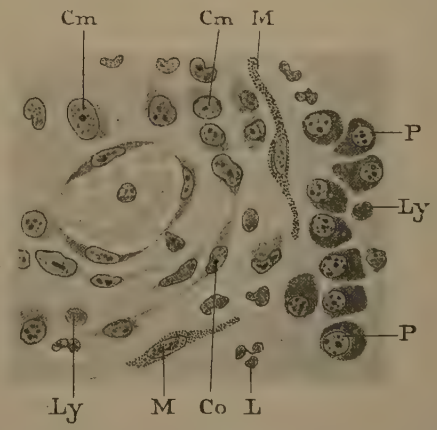


Fig. 214. — Principales formes cellulaires contenues dans le tissu conjonctif enflammé chroniquement. Peau de l'homme ; coupe d'une plaque de sclérodermie. Alcool, bleu polychrome. D'après Darier.

M, mastzelles ; — P, plasmazelles ; — L*y*, lymphocytes ; — L, leucocyte polynucléaire ; — C*o*, cellule conjonctive ; C*m*, cellules conjonctives mobilisées.

(1) Ce « granoplasma » (*Unna*) n'est, d'après *Dubreuil et Fabre* (*Archives d'An. micr*, XVII, 1921), que l'aspect donné par le chondriome et les grains de ségrégation insuffisamment fixés.

les a observées dans les glandes salivaires, dans la muqueuse intestinale, etc. Dans les taches laiteuses de l'épiploon du lapin, un certain nombre de cellules lymphoïde ont les caractères des cellules plasmatiques. Mais c'est surtout dans le tissu conjonctif atteint d'inflammation chronique que l'on trouve nombreux les plasmocytes : ils constituent la plupart des anciennes cellules dites « embryonnaires », les cellules des « granulomes » de *Virchow*, des infiltrations chroniques ou plasmomes (lésions tuberculeuses et syphilitiques, lésions du voisinage des néoplasmes, etc.). Ils montrent alors parfois un noyau double, plus rarement multiple, et des phénomènes de dégénérescence de leur cytoplasme.

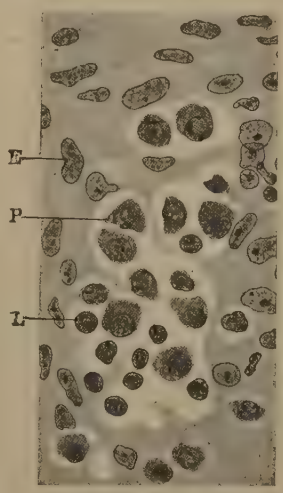


Fig. 215. — Homme (supplicié). Amygdale. Transformation des lymphocytes en cellules plasmatiques dans les cryptes épithéliales.

L, lymphocytes ; — *P*, plasmocytes ; — *E*, noyaux des cellules épithéliales. 750 diam.

Dans les lésions inflammatoires chroniques du tissu conjonctif et du tissu lymphoïde, dans les ganglions, dans les amygdales, etc., la transformation du lymphocyte en cellule plasmatique peut être suivie avec la plus grande facilité.

Dans les petits foyers de cellules lymphoïdes qui existent normalement dans le tissu conjonctif des jeunes individus et dont les taches laiteuses de l'épiploon du lapin forment l'exemple le plus connu, les cellules mésenchymateuses et les lymphocytes sont capables de former *in situ* des cellules plasmatiques (1). Il en est de même dans le tissu lymphoïde (ganglions, rate, amygdales, etc.) surtout lorsqu'il est atteint d'inflammation chronique. Mais, quand les cellules plasmatiques s'accumulent en grand nombre dans le tissu conjonctif enflammé, il faut bien admettre que les lymphocytes qui les ont formées sont venues du sang par diapédèse, car dans le tissu conjonctif normal, les lymphocytes sont toujours très disséminés. La cellule plasmatique naît donc sur place, aux dépens d'un lymphocyte, le plus souvent d'origine sanguine et diapédésé. Elle ne présente pas de figures de mitose.

On peut trouver chez les Oiseaux, les Reptiles et les Batraciens des cellules ayant les caractères des plasmocytes; mais elles sont rares à

(1) Jolly, *C. R. Ass. des anatomistes*, Lyon, 1901. — Downey, *Folia hæmatologica*, XI, 1911.

l'état normal et moins caractéristiques que chez les Mammifères. Dans le tissu lymphoïde des Oiseaux atteint d'inflammation chronique, on peut, comme chez les Mammifères, observer de la manière la plus nette la transformation d'un lymphocyte en plasmocyte.

Fig. 216. — Mitochondries des plasmazelles. Tissu conjonctif de l'homme. Bichromate de potasse-formol; hématoxyline au fer. D'après Dubreuil.

Par des méthodes appropriées (1), on peut mettre en évidence, au centre de la sphère attractive des cellules plasmatiques, un centriole, ordinairement double, et dans le cytoplasme, des grains de ségrégation et des mitochondries (2). Ces dernières sont souvent réduites à l'état de petits grains juxta-nucléaires. Dans les plasmocytes accumulés en groupes nombreux dans le tissu conjonctif enflammé chroniquement, il n'est pas rare de trouver des sphérules colorables par les couleurs acides (3). Ces sphérules hyalines ont été prises parfois pour des parasites. Elles peuvent être mises en liberté et semblent souvent précéder ou accompagner la destruction de la cellule (4). Ces sphérules peuvent se fusionner et se transformer en boules volumineuses. On ignore les relations de ces substances avec les granulations oxyphiles des leucocytes. Des granulations analogues à celles des leucocytes, granulations acidophiles et granulations basophiles ont été parfois vues dans des plasmocytes, mais le fait est exceptionnel (5). La transformation directe *in situ* des lymphocytes en leucocytes éosinophiles et en mastzelles paraît possible; cette transformation est beaucoup plus douteuse, lorsque le lymphocyte s'est transformé en une plasmazelle bien caractérisée.

Fig. 217. — Plasmocyte à corps hyalins (corps de Russell), dans le tissu conjonctif enflammé d'une plaie. D'après Policard.

Il n'est pas certain que la substance qui forme les corps fuchsinophiles (corps hyalins, corps de Russell) soit de même nature que les granulations éosinophiles des leucocytes. D'après les recherches récentes de *Regaud et Lacassagne*, après

(1) Coloration par l'hématoxyline au fer après fixation prolongée par le mélange bichromate-formol de Regaud.

(2) Dubreuil et Favre, *S. de Biologie*, 6 et 13 juin 1914 et *Archives d'An. micr.*, XVII, 1921.

(3) Elles ont été décrites souvent sous le nom de corps de Russell. Voir Favre et Dubreuil, *S. de Biologie*, 11 juillet 1914, et Policard, *S. de Biologie*, 22 juillet 1916.

(4) Dominici a décrit cette modification sous le nom de « dégénérescence érythrophile ». Voir Rubens-Duval, Th. Paris, 1908.

(5) Dubreuil et Favre, *S. de Biologie*, 4 juillet 1914 et 9 mars 1918 et *Archives d'An. micr.*, 1921. — Downey, *Verhandl. d. an. Gesellschaft*, Leipzig, 1911.

l'action de certaines fixations comme le Telly, les mastzelles conjonctives peuvent prendre l'aspect de cellules éosinophiles uninucléées, et il est probable que la confusion a été faite quelquefois.

Lymphocytes. — Des lymphocytes semblables à ceux du sang existent dans le tissu conjonctif lâche et dans celui des membranes. On les a observés chez l'homme, chez les Mammifères; ils existent aussi chez les Oiseaux et chez les Vertébrés inférieurs. Ils sont mobiles. Un certain nombre de ces éléments, surtout chez les jeunes individus, peuvent probablement se former sur place, car on observe des mitoses dans les taches laiteuses du lapin. Mais la plupart sont venus du sang (1).

Leucocytes. — Les leucocytes polynucléaires, chez l'homme et les Mammifères, dans le tissu conjonctif normal, sont rares et disséminés. Le fait contraste avec la facilité avec laquelle ils arrivent lorsque le tissu conjonctif est irrité. Ils viennent du sang par diapédèse, et sont destinés à une mort rapide. Contrairement aux lymphocytes, capables de se transformer en plasmocytes, les leucocytes polynucléaires sont incapables d'une évolution ultérieure; leur évolution, comme celle des hématies, est achevée.

Chez les Oiseaux et les Reptiles, le leucocyte de l'inflammation aiguë est représenté par la cellule à granulations éosinophiles arrondies ou cristalloïdes que nous avons étudiées dans le sang de ces animaux (ch. v). Ces éléments sont, dans les conditions normales, assez rares dans le tissu conjonctif.

Chez les Batraciens, les leucocytes polynucléaires qui représentent aussi le principal élément migrateur sont, dans le tissu conjonctif normal, moins rares que chez les Mammifères; ils sont relativement nombreux dans la lymphe péritonéale et dans la lymphe des sacs lymphatiques.

Si les leucocytes à noyau polymorphe sont exceptionnels dans le tissu conjonctif normal des Mammifères, il n'en est plus de même pour les leucocytes à granulations éosinophiles. Chez l'homme, ils sont encore rares; mais on les trouve facilement chez le rat, la souris, le cobaye, etc. Ils apparaissent presque toujours avec les mêmes caractères que dans le sang, avec un noyau polymorphe,

(1) La connaissance des formes d'irritation de la cellule conjonctive rend aujourd'hui ces distinctions moins importantes. Cependant, les cellules conjonctives et endothéliales irritées et devenues rondes ressemblent aux grandes cellules mononucléaires du sang et non aux véritables lymphocytes. Ceux-ci, en dehors du tissu lymphoïde, ne prennent guère naissance, chez l'adulte, qu'en des points très limités du tissu conjonctif lâche.

bilobé (homme, cobaye, cheval, etc.) ou annulaire (rat, souris). Le plus grand nombre sont venus du sang par diapédèse. Cependant, chez quelques animaux, par exemple chez le cobaye, on peut les observer sous forme de véritables foyers avec tous les passages entre un noyau incurvé et un noyau bilobé. Dans ce cas, les leucocytes éosinophiles se forment aux dépens d'une cellule lymphoïde germinative de grande taille (1). Mais ils peuvent se former aussi directement aux dépens d'un lymphocyte; le noyau prend alors la forme bilobée ou arrondie. Ces cellules sont distinctes des plasmocytes à corps oxyphiles et des leucocytes éosinophiles migrateurs dont le noyau a subi la nécrose pycnotique et s'est transformé en une seule petite masse colorable.

Les leucocytes éosinophiles existent, souvent nombreux, dans le tissu conjonctif de la muqueuse respiratoire, chez un grand nombre de mammifères (lapin, bœuf, veau, porc, cheval, etc.) et aussi dans la muqueuse intestinale, chez l'homme et chez les Mammifères; ils pénètrent jusque dans l'épithélium (2). On les observe aussi dans le tissu conjonctif des Oiseaux, des Reptiles et des Batraciens (3).

On peut trouver, dans le tissu conjonctif normal des différents vertébrés, des leucocytes à granulations basophiles (mastzelles sanguines). Ils sont toujours rares. Ils viennent du sang et sont distincts des cellules d'Ehrlich et des clasmatocytes.

Toutes les cellules libres qui se trouvent dans le tissu conjonctif n'ont pas un rapport certain avec l'hématopoièse. Il est probable que certaines d'entre elles représentent des cellules mésenchymateuses transformées et modifiées en vue d'une fonction de sécrétion interne ou d'accumulation de réserves. Les cellules déciduales, les cellules des glandes interstitielles appartiennent à cette catégorie. Certaines cellules granuleuses spéciales qu'on observe dans les muqueuses (4) sont probablement des éléments de même ordre. Il est fort possible que les mastzelles autochtones et même une partie des plasmazelles soient de même des cellules différenciées en vue d'une fonction d'élaboration particulière. De pareilles fonctions appartiennent du reste très vraisemblablement au tissu lymphoïde lui-même (5).

(1) Voir, pour les foyers myéloïdes du tissu conjonctif, ch. XI..

(2) SIMON, Th. Paris, 1904 ; — ZIETZSCHMANN, *Intern. Monatschr. f. Anat. u. Phys.*, XXII, 1905 ; — TEICHMÜLLER, *Deutsches Archiv f. klin. Medicin*, LX, 1898; — BERGONZINI, *An. Anzeiger*, VI, 1891 ; — WEILL, *Archiv f. mikr. Anatomie*, XCI, 1919.

(3) DANTSCHAKOFF, *Archiv f. mikr. Anatomie*, LXXIII, 1909; — MAXIMOFF, *Ziegler's Beiträge*, XXXIX, 1906 ; — DEKHUYZEN, *An. Anzeiger*, VI, 1891.

(4) WEILL P., *Archives d'An. micr.*, XVII, 1920.

(5) Voir ch. XVIII.

L'étude du tissu conjonctif nous a ainsi permis de reconnaître, en dehors de la cellule fixe et de ses différentes modalités (cellule endothéliale, cellule adipeuse, cellule pigmentaire, etc.) deux groupes d'éléments : les uns, semblables aux leucocytes du sang, les autres (mastzelles, plasmocytes), tout à fait distincts. Les premiers viennent en grande majorité des vaisseaux par diapédèse; les autres sont surtout formés sur place; les plasmocytes, en particulier, représentent un lymphocyte transformé.

La seule observation du tissu conjonctif normal, chez un animal adulte, ne suffit pas à mettre en évidence les relations de ces différentes cellules. Il faut, pour résoudre ces problèmes, étudier l'histogénèse du tissu conjonctif chez l'embryon, c'est ce que nous ferons plus loin (1). Il faut aussi, par l'expérimentation, augmenter l'activité fonctionnelle de ces cellules, rendre leur évolution et leurs transformations plus intenses et plus rapides.

Ces expériences peuvent être réalisées sur le tissu conjonctif diffus sous-cutané; elles ont été faites plus souvent encore sur les membranes séreuses, sur le mésentère et sur l'épiploon. Mais comme ces membranes se trouvent plongées dans la cavité péritonéale, il est nécessaire de dire d'abord quelques mots des cellules qui se trouvent dans les sérosités.

Leucocytes des cavités séreuses. — Chez les Mammifères adultes, à l'état normal, on trouve dans les grandes cavités une certaine quantité de liquide séreux. Chez le lapin il est assez abondant, très transparent et presque incolore.

Il faut d'abord observer cette sérosité vivante et sans réactifs. On sacrifie un lapin par section du bulbe. Après avoir fendu la peau de l'abdomen, on la détache doucement de la paroi musculaire ; la cavité abdominale est ouverte par une petite boutonnière faite au fer rouge de façon à ne pas répandre le sang ; avec une pipette dont l'extrémité est dirigée vers le petit bassin, on recueille un peu de sérosité transparente qu'on examine dans une chambre humide. Un certain nombre de globules blancs sont de petite taille et ont tout l'aspect de lymphocytes, mais leur noyau n'est guère visible ; d'autres sont plus grands, à protoplasma granuleux. Ces derniers, qui correspondent aux leucocytes polynucléaires et aux leucocytes éosinophiles, ont des mouvements amiboïdes très actifs déjà à la température de 25-30°, tandis que les lymphocytes sont peu mobiles. A côté de ces cellules, semblables aux leucocytes du sang, on en observe d'autres, plus grandes, arrondies, à protoplasma homogène. Leur noyau, ovalaire ou légèrement réniforme, est visible et limité par une fine membrane. A la température du laboratoire, ces éléments paraissent complètement immobiles ; si on élève la

(1) Voir ch. XI.

température jusqu'à 37°, on y observe de lentes et très légères déformations des contours, des mouvements protoplasmiques internes, mais pas de véritables mouvements amiboïdes. Ces grandes cellules ont une tendance à s'étaler sur la lame de verre; de plus, on les voit émettre des bourgeons vacuolés remplis d'une substance fluide et qui crèvent; lorsque la vacuole s'est ouverte à l'extérieur, le protoplasma revient sur lui-même.

Fig. 218. — Lymphe péritonéale du rat. Cellule libre en mitose. 800 diam.

Si on recueille de la même façon une goutte de lymphe péritonéale chez le rat, le résultat de l'observation est un peu différent : le liquide est trouble, opalescent; en plus des lymphocytes et des grosses cellules hyalines, il contient des leucocytes granuleux, mobiles, qui correspondent aux leucocytes éosinophiles et de volumineux éléments granuleux, moins nombreux, immobiles, dont les granulations sont faciles à colorer par le rouge neutre; ce sont des cellules d'Ehrlich.

Sur des préparations de sérosité péritonéale du rat fixées et colorées, on reconnaît facilement : des lymphocytes, des leucocytes à granulations éosinophiles très fines, à noyau annulaire ou en fer à cheval; des cellules d'Ehrlich; enfin, de gros éléments arrondis, à protoplasma homogène, à noyau volumineux, pauvre en chromatine, ovalaire ou réniforme. Ces éléments rappellent l'aspect des grands mononucléaires du sang. On peut y rencontrer, constamment, chez le rat, à l'état normal, des noyaux en caryocinèse (1).

Chez le cobaye, on observe des lymphocytes, des leucocytes éosinophiles, et des cellules mononucléaires hyalines (2). Le noyau des leucocytes éosinophiles est presque toujours bilobé, comme dans le sang. Chez le chien, on trouve surtout de grandes cellules hyalines (3).

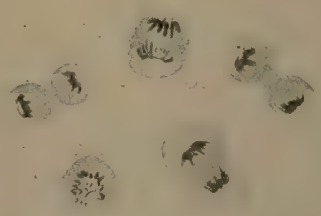


Fig. 219. — Lézard (*Lacerta viridis*). Lymphe péritonéale. Cellules libres en mitose. 830 diam.

Ce qui domine, dans la sérosité des grandes cavités, chez les Mammifères, ce sont donc ces grandes cellules à noyau arrondi ou incurvé, et à protoplasma homogène. Elles existent parfois à l'exclusion d'autres variétés cellulaires; elles contiennent souvent des restes de globules rouges phagocytés et du pigment sanguin. On y voit des vacuoles dans lesquelles le rouge neutre colore des grains de sécrétion (4). On peut y mettre en évidence des mitochondries (5).

A cette grande cellule hyaline, qui domine, se trouvent presque toujours associés en nombre variable, des lymphocytes; chez quelques mammifères (rat, cobaye), on observe aussi des leucocytes éosinophiles; enfin, chez le rat, on observe

(1) Jollet, *S. de Biologie*, 21 juillet 1900.

(2) Kanthack and Hardy, *J. of Physiology*, XVII, 1894; — Beattie, *J. of Path. and Bact.*, VIII, 1903; — Schott, *Archiv f. mikr. Anatomie*, LXXIV, 1909; — Stäubli, *Deutsches Archiv f. klin. Medicin*, LXXXV, 1905.

(3) Schott, *l. c.*; — Wallgren, *Ziegler's Beiträge*, XXV, 1899.

(4) Renaut, *C. R. Ass. des anatomistes*, Genève, 1905 et *Bibliographie* an. 1906.

(5) Dubreuil, *Arch. d'anat. micr.*, XV, 1913.

de grosses mastzelles, mais en nombre moindre. A l'état normal, les leucocytes polynucléaires sont exceptionnels. Il semble en être de même chez l'homme, où les grandes cellules hyalines dominent (1).

Nature et origine des cellules de la sérosité péritonéale. — Les polynucléaires, qui du reste, chez la plupart des Mammifères, sont rares dans les sérosités normales, sont des éléments d'origine sanguine ; ils sont venus des vaisseaux par diapédèse. Il en est de même pour le plus grand nombre des lymphocytes ; une partie d'entre eux a pu cependant se former dans le tissu conjonctif même du péritoine, au niveau des amas lymphoïdes qu'on appelle les taches laiteuses; un petit nombre proviennent des lymphatiques. Les leucocytes éosinophiles proviennent, en grande majorité, du sang, comme les polynucléaires ; une très petite partie d'entre eux sont capables de se former directement, dans le tissu conjonctif péritonéal, aux dépens de lymphocytes. Quant aux grosses cellules hyalines à noyau arrondi, elles représentent des cellules endothéliales de revêtement, gonflées, desquamées, mobilisées ; elles ne sont pas dégénérées, comme le montrent l'aspect de leur noyau et les phénomènes de multiplication qu'elles présentent ; elles ont simplement perdu leurs connexions primitives. Ce ne sont donc pas des cellules venues du sang, mais des éléments nés sur place, et résultant de la transformation des cellules endothéliales de revêtement. L'endothélium des sinus lymphatiques des ganglions est capable de subir la même transformation et il est bien probable qu'une partie des grands mononucléaires du sang est d'origine endothéliale ; mais ces cellules d'origine lymphatique ou ganglionnaire n'arrivent qu'en petit nombre dans les cavités séreuses.

Fig. 220. — Lymphe péritonéale du lapin examinée en chambre humide à 38°. Cellule endothéliale libre fixée pendant son étalement. 1.200 diam.

(1) Chez le bœuf, chez les individus normaux ne présentant aucun parasite intestinal ni de microbes libres dans le péritoine, Sabrazès et Muratet trouvent dans la sérosité abdominale 7 à 36 p. 100 de polynucléaires auxquels s'ajoutent environ 20 p. 100 de lymphocytes, 30 p. 100 de cellules éosinophiles et 30 p. 100 de cellules hyalines mononucléaires. Mais les polynucléaires contenaient des bactéries, ce qui semble montrer que chez ces animaux, la sérosité est presque normalement infectée. On sait, du reste, qu'à certaines périodes de la digestion, la lymphe du canal thoracique contient, chez eux, des bactéries. Sabrazès et Muratet, dans la sérosité du cheval et du mouton, trouvent aussi des polynucléaires ; de même, dans la plèvre du bœuf (*Gaz. hebd. des sc. méd. de Bordeaux*, 11 novembre 1900).

RÉACTION INFLAMMATOIRE DU TISSU CONJONCTIF

Les relations qui existent entre les différentes cellules qu'on trouve dans le tissu conjonctif et dans les sérosités apparaissent avec beaucoup plus de netteté au cours des réactions inflammatoires.

L'expérience la plus simple consiste à injecter, dans la cavité péritonéale d'un rat ou d'un cobaye, quelques gouttes d'une solution de nitrate d'argent à 1 p. 300. On fait l'expérience en série en injectant plusieurs animaux de la même espèce et on les sacrifie à des intervalles déterminés, après 24 heures, 48 heures, 3 jours, etc. On recueille l'épiploon ou des fragments de l'épiploon, et on en fait des préparations sur lame suivant les techniques que nous avons déjà indiquées. Sur les préparations de l'épiploon recueilli au bout de 24 heures, on aperçoit, accolées à la surface de l'épiploon, un nombre considérable de cellules arrondies, volumineuses, à noyau arrondi, ovalaire ou réniforme, ressemblent aux grosses cellules hyalines de la sérosité péritonéale. Elles forment, par places, de véritables amas à la surface des travées conjonctives, et entre elles, on aperçoit des leucocytes polynucléaires et quelques leucocytes éosinophiles, bien reconnaissables par leur taille plus petite et leur noyau polymorphe. En dehors de ces amas, les travées conjonctives paraissent nues, dépouillées, au moins en beaucoup d'endroits : on n'y distingue plus les noyaux endothéliaux et à la suite d'une imprégnation par l'argent les figures si caractéristiques de l'endothélium n'apparaissent plus qu'en des points limités. En examinant, sur les préparations fixées et colorées, les places où la réaction semble avoir été moins vive, on aperçoit des cellules endothéliales dont le protoplasme est plus coloré que d'habitude ; il est légèrement teinté par la couleur nucléaire; la cellule est comme gonflée, ramassée sur elle-même; elle tend à se détacher des faisceaux conjonctifs sur lesquels elle s'appuie.

Fig. 221. — Cobaye. Injection de nitrate d'argent dans la cavité péritonéale 24 heures auparavant. Épiploon. Cellules endothéliales irritées, en train de se libérer de leurs connexions. 500 diam.

La cellule endothéliale répond à l'excitation en se gonflant ; elle perd sa forme lamelleuse et devient sphérique. Un certain nombre de ces cellules globuleuses restent accolées aux travées épiploïques où elles forment des amas. Les autres tombent dans la cavité péritonéale où on les retrouve libres, augmentant le nombre des grosses cellules hyalines. Les leucocytes polynucléaires, peu nombreux au début, commencent à affluer par diapédèse ; on les trouve dans les vaisseaux, dans le tissu conjonctif, à la surface de l'épiploon parmi les cellules endothéliales modifiées, et aussi dans la sérosité abdominale.

La cellule endothéliale, gonflée par l'irritation inflammatoire, a acquis des propriétés nouvelles : elle est devenue capable d'incorporer des corps étrangers, en particulier des globules rouges. Elle incorpore aussi des leucocytes polynucléaires. Les leucocytes polynucléaires diapédésés sont des éléments qui ne sont

plus susceptibles d'évolution. La plupart sont destinés à mourir. La masse protoplasmique beaucoup plus grande de la cellule endothéliale enflammée, douée d'une grande vitalité, n'a pas de peine à les englober.

Cette propriété acquise par les cellules endothéliales au cours de la réaction inflammatoire se voit mieux encore si à la solution de nitrate d'argent on a ajouté des substances pulvérulentes (vermillon, cinabre, noir de fumée, etc.). On peut aussi injecter d'abord le nitrate d'argent et 12 ou 24 heures après, injecter une suspension de vermillon dans l'eau salée à 8 p. 1.000. On sacrifie l'animal le lendemain et on constate que les cellules endothéliales, comme les leucocytes, ont absorbé le vermillon.

Fig. 222. — Cobaye. Épiploon. Injection de nitrate d'argent dans la cavité péritonéale 24 h. auparavant. Cellule endothéliale venant de se mobiliser. 560 diam.

Un certain nombre de cellules endothéliales ont subi une autre modification : elles sont fusiformes et allongent très loin chacun de leurs prolongements qui s'accolent souvent aux filaments de fibrine. D'autres ont un aspect plus compliqué : leurs prolongements, multiples, souvent larges, se ramifient et sont unis à ceux des cellules voisines. Ces cellules endothéliales ont pris l'aspect de véritables cellules conjonctives.

Parmi les cellules endothéliales qui sont restées à la surface de la membrane, on en trouve toujours un certain nombre en caryocinèse. Elles sont globuleuses, ovoïdes, sans prolongements ; leur protoplasma homogène, foncé, prend toujours plus ou moins les colorants nucléaires. On les rencontre déjà à un stade précoce, 12 à 24 heures après l'injection de nitrate d'argent ; on les observe aussi les jours suivants (1). La plupart de ces figures de mitose appartiennent aux cellules endothéliales qui tapissent la surface de la membrane ; mais les cellules conjonctives et les cellules endothéliales vasculaires montrent aussi, très nettement, ces phénomènes de multiplication. Les cellules endothéliales péritonéales qui subissent la mitose ont perdu leurs connexions avec les cellules voisines ; elles sont en général gonflées, globuleuses ; on comprend qu'elles puissent devenir complètement libres et que, parmi les grosses cellules de l'exsudat, on trouve toujours quelques éléments dont le noyau est en caryocinèse.

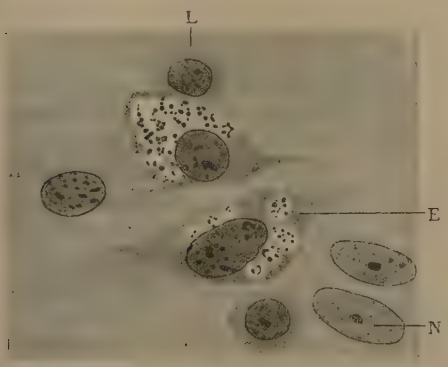


Fig. 223. — Epiploon du rat. Injection de nitrate d'argent dans la cavité péritonéale 48 heures auparavant. Deux cellules endothéliales en réaction, E.

Elles sont gonflées, en partie libérées de leurs attaches et bourrées de leucocytes polynucléaires phagocytés, dont le noyau est en caryolise ; — *N*, noyaux de cellules endothéliales au repos ; — *L*, cellules endothéliales complètement mobilisées. 830 diam.

Dans les jours suivants, le réseau des grosses cellules étoilées et anastomosées

(1) Toupet, Th. Paris, 1887.

commence à se resserrer; les prolongements se rétractent; les cellules se rapprochent les unes des autres, s'affrontent et reforment une plaque endothéliale superficielle, tout en restant anastomosées. On peut donc les considérer avec *Ranvier* (1) comme étant confondues dans leurs parties profondes et séparées les unes des autres seulement dans leurs portions superficielles, de sorte que les interstices intercellulaires dans lesquels l'argent se réduit lors des imprégnations, n'intéressent probablement qu'une partie de l'épaisseur de la cellule.

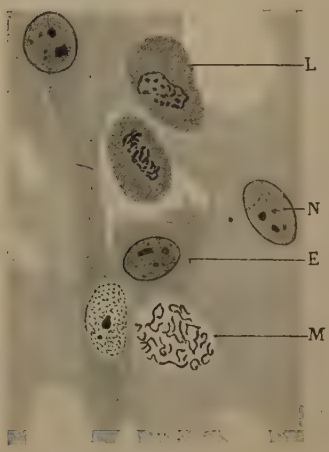


Fig. 224. — Épiploon du rat. Injection de nitrate d'argent dans la cavité abdominale 48 heures auparavant. Cellules endothéliales en division.

N, noyau d'une cellule endothéliale au repos; — *M*, noyau d'une cellule endothéliale en mitose; *L*, deux cellules endothéliales au stade final de la mitose et libérées de leurs connexions ; ce sont les deux cellules filles d'une même division ; — *E*, cellule endothéliale gonflée et en partie libérée. 650 diam.

Parmi les cellules endothéliales tombées dans l'exsudat, quelques-unes présentent les signes d'une désintégration nucléaire. Enfin, beaucoup des leucocytes qui n'ont pas été englobés meurent et montrent un noyau en pycnose.

Ainsi, sous l'influence d'une irritation simple, aseptique, par une substance définie et caustique, les cellules endothéliales se gonflent; une partie d'entre elles tombent dans la cavité péritonéale. Celles qui sont restées à la surface de la membrane se multiplient, étendent leurs prolongements ramifiés et anastomosés, puis se rapprochant les unes des autres, reconstituent de nouveau un endothélium. La réparation est en général effectuée vers le 7e ou 8e jour.

L'expérience peut être réalisée autrement, avec d'autres substances que le nitrate d'argent : l'injection d'eau distillée stérilisée, de bouillon stérilisé, de sérums étrangers produit une réaction analogue. L'injection d'une suspension de vermillon ou d'autres poudres inertes, ou de globules rouges dans l'eau salée à 8 p. 1.000, produit aussi des effets du même ordre, très atténués il est vrai (2). A la réaction de la cellule endothéliale s'ajoute toujours l'afflux d'un certain nombre de leucocytes polynucléaires venus du sang, qui incorporent les substances pulvérulentes, meurent ou sont eux-mêmes incorporés.

Les expériences précédentes sont fondamentales. Elles nous montrent que dans la réaction inflammatoire la plus simple du tissu conjonctif, une part revient à la diapédèse, une autre à la cellule fixe.

Les cellules endothéliales du revêtement péritonéal ne sont pas les seules cel-

(1) Ranvier, *C. R. Ac. des sc.*, 20 avril 1891.

(2) L'injection de suspensions de vermillon en eau salée isotonique ne produit que des réactions très faibles. Dans ce cas, on trouve du vermillon dans les leucocytes, mais peu ou pas dans les cellules endothéliales. Celles-ci, au contraire, contiennent du vermillon si, auparavant, on a injecté du nitrate d'argent. Dans toutes ces expériences, il faut introduire peu de liquide (quelques gouttes chez un rat, 1 cc. chez un cobaye). Si la quantité de liquide injecté est trop grande, on produit des phénomènes d'œdème cellulaire et des desquamations qui masquent la réaction inflammatoire véritable de la cellule fixe

lules fixes qui montrent de pareilles réactions. Les cellules conjonctives contenues dans l'épaisseur de la membrane réagissent à peu près de la même manière. Les cellules de Ranvier (clasmatocytes des mammifères) disparaissent aussi en partie au début de la réaction inflammatoire et se transforment en cellules arrondies (1). Enfin les cellules endothéliales vasculaires et les cellules des taches laiteuses participent aussi à ces phénomènes. Beaucoup de cellules endothéliales vasculaires sont gonflées et présentent des figures de caryocinèse. Les cellules lymphoïdes et conjonctives des taches laiteuses contribuent aussi à former les amas de cellules libres, sphériques, à noyau arrondi, qu'on trouve à la surface de l'épiploon. Les taches laiteuses, si faciles à observer dans l'épiploon des jeunes lapins, sont formées par des cellules conjonctives, étroitement et largement anastomosées et par des éléments lymphoïdes formés sur place à leurs dépens, comme pendant la période embryonnaire, et qui se multiplient ensuite par mitose (2). Ces taches laiteuses sont donc tout à fait comparables aux foyers lymphoïdes mésenchymateux qu'on trouve dans tout le tissu conjonctif de l'embryon, et que nous étudierons plus loin (voir ch. XI). Une partie d'entre elles constituent des ébauches adipeuses; beaucoup de leurs cellules lymphoïdes se transforment les unes en cellules graisseuses, d'autres en plasmazelles. Dans l'inflammation, ces cellules lymphoïdes se mobilisent ; les

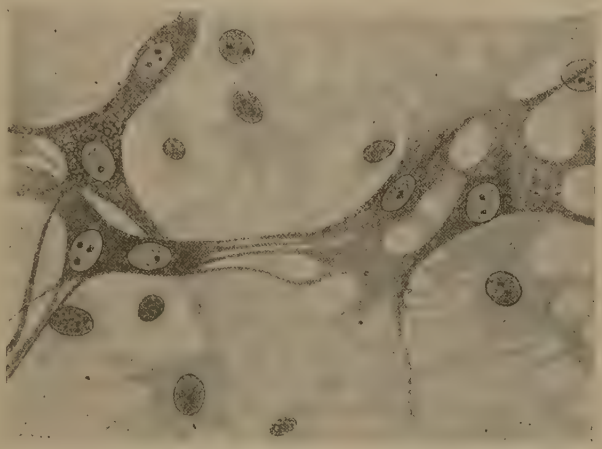


FIG. 225. — Rat. Épiploon. Injection intra-abdominale de nitrate d'argent 4 jours auparavant. Stade de reconstitution de l'endothélium aux dépens des cellules fixes (endothéliales et conjonctives), modifiées par l'inflammation et dont le réseau anastomotique se resserre progressivement. 375 diam.

(1) Leur destinée semble à peu près la même que celle des cellules conjonctives et endothéliales. Elles rentrent dans la catégorie des « polyblastes » de MAXIMOFF. Pour MAXIMOFF, les grosses cellules lymphoïdes à noyau arrondi que l'on voit dans le tissu conjonctif enflammé et qu'il appelle *polyblastes* proviennent de la transformation de lymphocytes et de cellules migratrices immobilisées. Le rôle des cellules endothéliales des séreuses dans l'inflammation a été méconnu par MAXIMOFF et ses élèves (voir TSCHASCHIN, *Folia haematologica*, XVI, 1913). Pour eux, les cellules endothéliales ne prennent aucune part à la formation des grosses cellules libres (polyblastes, macrophages). Elles dégénèrent et disparaissent. Le rôle des cellules endothéliales dans l'inflammation est au contraire exactement indiqué dans les travaux de DOMINICI (*Archives de méd. exp.*, 1902), de CORNIL et MARIE (*Congrès int. méd.*, 1900), et de WEIDENREICH et SCHOTT (*Arch. f. mikr. An.*, LXXIV, 1909).

(2) JOLLY, *C. R. de l'Ass. des anatomistes*, Lyon, 1901.

cellules conjonctives anastomosées qui forment la trame s'allongent, s'avancent plus ou moins loin et sont capables, lors de la réparation, de participer à la réfection de l'endothélium (1).

Chez les Batraciens, les clasmatocytes-mastzelles perdent, au début de l'inflammation, leurs formes arborisées et se transforment en cellules arrondies (2).

La réaction inflammatoire aiguë aseptique des membranes péritonéales est donc constituée par deux phénomènes : un afflux de leucocytes sanguins, sortis des vaisseaux par diapédèse et qui sont en grande majorité des polynucléaires ; une réaction de toutes les cellules fixes, autochtones et particulièrement des cellules endothéliales qui se mobilisent et dans lesquelles l'irritation développe de nouvelles propriétés et en particulier un pouvoir de phagocytose considérable. Ces gros éléments arrondis, libres, qui correspondent aux *macrophages* de *Metchnikoff* et aux *polyblastes* de *Maximoff*, ne sont donc pas des cellules sanguines ou lymphatiques attirées des vaisseaux par chimiotaxie (3).

Réaction inflammatoire subaiguë et chronique. — Si, chez un cobaye ou un lapin, on répète les injections irritantes, on voit apparaître dans l'exsudat des lymphocytes et dans l'épaisseur de la membrane, surtout au voisinage des vaisseaux, des lymphocytes et des cellules plasmatiques. Ces réactions se voient bien dans les expériences où l'on a injecté des corps étrangers pulvérulents en quantité

(1) Comme l'a montré Dominici (*Archives d'An. micr.*, 1920-1921), les cellules lymphoïdes de la tache laiteuse paraissent capables de se transformer en cellules conjonctives et en cellules endothéliales.

(2) Ranvier, *C. R. Ac. des sc.*, 6 et 27 avril 1891 et *Archives d'An. mic.*, III, mars 1900. — Maximoff, *Ziegler's Beiträge*, XXXIX, 1906. On peut faire l'expérience chez la grenouille en cautérisant l'œsophage au fer rouge et en examinant ensuite la membrane périœsophagienne. On peut aussi, après cautérisation, faire des coupes de l'expansion membraneuse de la queue, chez le triton ou l'axolotl. On peut enfin examiner le mésentère après injection d'une goutte d'une solution de nitrate d'argent à 1 p. 500 dans l'abdomen.

(3) Metchnikoff (*Annales Pasteur*, 1898. — Leçons sur l'inflammation. — Immunité), ne considérant que la faculté d'absorption de ces cellules, les appela macrophages par opposition aux phagocytes de petite taille, les leucocytes polynucléaires, qu'il nommait microphages. Le terme de macrophage s'applique en réalité à un grand nombre d'éléments différents, à tous les éléments anatomiques fixes, dont le pouvoir de phagocytose ne s'exerce que dans certaines conditions (cellule endothéliale, cellule conjonctive de charpente, cellule endothéliale des sinus lymphatiques, cellules de l'épithélium pulmonaire, etc.). La ressemblance des cellules hyalines arrondies de la sérosité péritonéale avec les gros leucocytes mononucléaires du sang faisait croire à *Metchnikoff* qu'il s'agissait des mêmes cellules. Il est très probable que les grands mononucléaires du sang proviennent en partie des cellules endothéliales des sinus lymphatiques des ganglions ; mais les grosses cellules apparues en abondance dans le péritoine des Mammifères, à la suite de l'injection d'eau stérilisée, de bouillon, de sérum de cheval, etc., sont des cellules provenant surtout de l'endothélium péritonéal et non point une variété de leucocytes attirés du sang ou de la lymphe par chimiotaxie élective.

assez grande ; tant qu'ils n'ont pas été absorbés, ils entretiennent, par leur présence, les phénomènes d'irritation. Au niveau des points où ils restent accumulés, il se produira, à la suite de la réaction des cellules fixes et de la diapédèse des polynucléaires, de petits nodules inflammatoires formés en partie de lymphocytes et de cellules plasmatiques.

Les lymphocytes sont en majorité d'origine sanguine ; une petite partie vient des taches laiteuses ; les plasmocytes proviennent de la transformation *in situ* des lymphocytes. Ces nodules inflammatoires chroniques peuvent être produits par l'injection, dans la cavité abdominale, de poudre de lycopode (1) et aussi de poudres irritantes comme le poivre pulvérisé (2), de suspensions de microbes morts et enfin par l'injection de cultures microbiennes vivantes. A ce sujet, le bacille de la tuberculose a été souvent utilisé (3).

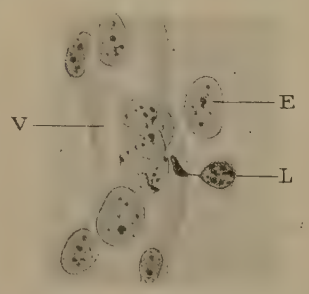


Fig. 226. — Épiploon du rat, enflammé. Diapédèse d'un lymphocyte.

V, vaisseau sanguin ; — *L*, lymphocyte ; — *E*, noyau d'une cellule endothéliale. 930 diam.

On a souvent discuté la part de la réaction de la cellule fixe et de la diapédèse dans la formation de ces tubercules et pseudotubercules. La question semble aujourd'hui tranchée. La réaction primitive est formée par les cellules fixes ; la diapédèse donne les polynucléaires dont l'afflux constitue une réaction momentanée ; ces leucocytes sanguins ne sont destinés à aucune évolution ultérieure ; ils disparaissent plus ou moins vite et leurs débris sont phagocytés par les cellules conjonctives. La diapédèse donne ensuite les lymphocytes qui se transforment *in situ* en cellules plasmatiques.

La réaction inflammatoire peut être aussi étudiée en introduisant dans la cavité péritonéale des corps étrangers volumineux. Si le corps étranger est poreux (fragment d'éponge, caillot fibrineux, etc.), on trouve à l'intérieur des leucocytes polynucléaires et tout autour un exsudat fibrineux dans lequel sont incorporés de grandes cellules ramifiées provenant de l'endothélium péritonéal et auxquelles se trouvent mélangés des lymphocytes et des polynucléaires. Si le corps étranger n'est pas poreux, on le trouve simplement entouré de la membrane inflammatoire formée de fibrine, de cellules endothéliales transformées, de polynucléaires et de lymphocytes.

(1) Renaut et Dubreuil, *S. de Biologie*, 30 janvier 1906.
(2) Gougerot et Vaucher, *J. de médecine interne*, 30 avril 1909.
(3) Renaut et Dubreuil, *Bibliographie anatomique*, XIX, 1909.

L'origine et la destinée des lymphocytes qui apparaissent dans ces diverses expériences, à la suite des polynucléaires est parfois difficile à déterminer exactement. La plupart viennent du sang par diapédèse ; un petit nombre paraissent être formés dans l'épiploon même, aux dépens des taches laiteuses et des cellules périvasculaires (1). Mais ils peuvent avoir encore une autre origine, c'est la lymphe. La lymphe du canal thoracique et des troncs lymphatiques est formée presque exclusivement de lymphocytes (2). Or, on sait depuis les expériences de *Ludwig* et *Schweigger-Seidel* et de *Ranvier* (3) que la cavité péritonéale communique avec les lymphatiques du diaphragme. Bien que ces communications directes des grandes cavités séreuses avec les lymphatiques soient secondaires et beaucoup moins importantes qu'on ne le croyait encore il y a quelques années (4), de nombreux faits d'observation permettent d'admettre leur existence (5). Toutefois, les lymphocytes qui dans l'inflammation chronique du péritoine arrivent par cette voie paraissent fort peu nombreux (6).

La destinée des lymphocytes émigrés dans le tissu conjonctif au cours de l'inflammation chronique n'est pas complètement élucidée. Une grande partie se transforment en cellules plasmatiques directement ; un petit nombre paraissent capables, dans certaines circonstances, de se transformer en leucocytes éosinophiles (7) et en mastzelles (8). Enfin, un certain nombre d'auteurs admettent avec *Dominici* (9) que les lymphocytes peuvent se transformer en cellules conjonctives véritables ; mais c'est là un fait qui n'est pas encore absolument démontré. D'après les idées soutenues par *Dominici*, le lymphocyte migrateur, capable de se transformer en cellule conjonctive serait ainsi une cellule lympho-conjonctive et le tissu lym-

(1) Herzog, *Ziegler's Beiträge*, LXI, 1916. Voir aussi Shridde, *Münchener med. Woch.*, 26 sept. 1905; — Fischer, *Ziegler's Beiträge*, XLV, 1909; — Dominici, *Archives d'An. micr.*, 1920-21.

(2) Hayem, *Soc. de Biologie*, 8 juillet 1899.

Biedl et Decastello, *Archiv f. d. ges. Physiologie*, LXXXVI, 1901; — Rous, *J. of. exp. med.*, X, 1908 ; — Weidenreich, *Die Leukocyten*, l. c.

(3) Ranvier, *Traité technique d'Histologie*.

(4) Voir ch xviii.

(5) Les globules rouges de même espèce introduits dans le péritoine sont en partie absorbés sans modifications par les vaisseaux lymphatiques. On les retrouve dans le canal thoracique (voir Hayem, *C. R. Ac. des sciences*, 1884; Lesage, *S. de biologie*, 9 juin 1900 et *Th. sc. Paris*, 1902; Metchnikoff, *Immunité*, 1901).

(6) Il en est de même des grosses cellules endothéliales rondes provenant de l'endothélium des sinus lymphatiques des ganglions ; leur passage dans les grandes cavités séreuses est probablement exceptionnel (voir Weidenreich, *Verh. der An. Gesellschaft*, Wurzburg, avril 1907, et *Leukocyten*, l. c.)

(7) Dominici, *Folia hæmatologica*, VIII, 1909.

(8) Downey, *Verh. d. an. Gesellschaft*. Leipsig, avril 1911.

(9) Dominici, *Archives d'An. microsc.*, 1920-21.

phoïde, par ses lymphocytes, constituerait chez l'adulte, une véritable réserve de mésenchyme (1).

Inflammation pleurale expérimentale. — Les expériences réalisées sur la plèvre donnent les mêmes résultats. Mais ici, la technique est un peu différente, parce que les deux plèvres sont accolées et que la cavité pleurale est virtuelle. On peut cependant injecter quelques gouttes de nitrate d'argent, chez le lapin, ou mieux chez le chien, en faisant pénétrer une aiguille mousse ou un fin trocart très obliquement, parallèlement à l'axe d'un espace intercostal (2).

On étudie la réaction pleurale sur des coupes du poumon. Les cellules endothéliales apparaissent au bout de vingt-quatre heures, gonflées, globuleuses; beaucoup sont éliminées; celles qui subsistent émettent ensuite des prolongements considérables qui suivent les filaments de la fibrine exsudée; ces cellules se multiplient par caryocinèse et la réaction atteint aussi les cellules conjonctives du tissu sous-endothélial. Si la cautérisation par le nitrate d'argent a été plus intense, la membrane fibrineuse exsudée est plus épaisse ; elle est pénétrée par les cellules endothéliales et conjonctives, puis par de nouveaux vaisseaux. Vers le 8e jour, des fibrilles conjonctives apparaissent, et vers le 20e jour, on trouve un épaississement fibreux de la plèvre et parfois des adhérences des deux feuillets. Ces expériences peuvent être réalisées aussi par une cautérisation légère et localisée de la plèvre pulmonaire ; on étudie la réaction au voisinage de l'eschare.

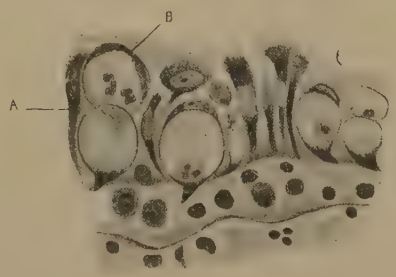


Fig. 227. — Réaction de l'endothélium pleural au voisinage d'une brûlure du poumon par le thermocautère chez un chien.

A, cellules endothéliales devenues pédiculées; — *B*, cellules endothéliales devenues globuleuses et vacuolaires; certaines vacuoles contiennent des leucocytes. 525 diam. D'après Vermorel.

Dans ces inflammations pleurales aseptiques, les leucocytes sont relativement peu nombreux. Il afflue toujours un certain nombre de polynucléaires, mais ils disparaissent rapidement. Dans les inflammations expérimentales septiques au contraire, les leucocytes sont abondants. C'est ce qu'on voit aussi dans la pleurésie consécutive à une pneumonie chez l'homme. Les lésions histologiques sont très comparables, mais les polynucléaires sont beaucoup plus abondants et l'activité des cellules conjonctives est ralentie et masquée. L'organisation de la fausse membrane est moins rapide.

La réaction lente et atténuée de la plèvre peut être réalisée par l'introduction de corps étrangers comme de petits fragments d'éponge bien décalcifiés et stérili-

(1) La cellule lympho-conjonctive, pour *Dominici*, c'est avant tout la cellule endothéliale du péritoine mobilisée ; c'est aussi la cellule embryonnaire, lymphoïde, des taches laiteuses ; c'est enfin, par extension, le lymphocyte sanguin venu des ganglions et du tissu lymphoïde tout entier ; c'est sur ce dernier point seulement qu'il convient de faire quelques réserves. L'assimilation complète, si souvent faite, de la cellule endothéliale mobilisée au lymphocyte est assurément forcée.

(2) Péron, Th. Paris, 1896 ; — Vermorel, Th. Paris, 1898.

sés par ébullition prolongée dans l'eau. Le fragment d'éponge est rapidement enveloppé et pénétré par de la fibrine dont les filaments servent ensuite de conducteurs aux prolongements des cellules conjonctives. Autour des corpuscules de spongine on voit apparaître de nombreuses cellules géantes à noyaux multiples ou plasmodies, semblables à celles du tubercule et qui sont vraisemblablement formées aux dépens des cellules conjonctives et endothéliales.

Fig. 228. — Coupe d'une éponge introduite 5 jours avant dans la cavité pleurale d'un chien. Formation de cellules géantes (*G*, *G'*), autour des corpuscule de spongine (*S*); — *C*, capillaires néoformés ; — *V*, vacuoles intracytoplasmiques. 260 diam. D'après Vermorel.

Inflammation du tissu conjonctif sous-cutané. — Les expériences sur le tissu conjonctif sous-cutané permettent de faire des observations analogues à celles que nous venons de rapporter. Ces expériences peuvent être faites de bien des façons : injection sous-cutanée de substances irritantes, caustiques ou pulvérulentes, introduction de corps étrangers aseptiques, etc. (1).

La plupart de ces inoculations produisent une réaction inflammatoire lente qui aboutit le plus souvent à la formation, autour du corps étranger, d'une infiltration nodulaire composée surtout de lymphocytes, de cellules plasmatiques et de cellules géantes. Lorsqu'il s'agit de poudres inertes, les lésions qui constituent ces pseudo-tubercules peuvent être fugaces ; lorsqu'il s'agit de gros corps étrangers inertes, la réaction inflammatoire est légère ; mais on voit apparaître des cellules géantes formées aux dépens des éléments conjonctifs. Les poudres irritantes permettent d'obtenir plus facilement l'infiltration nodulaire. Le poivre pulvérisé et émulsionné dans l'eau salée à 8 p. 1.000 donne de bons résultats. Les nodules inflammatoires formés ressemblent parfois aux véritables follicules tuberculeux avec leurs cellules géantes centrales, leur zone épithélioïde et leurs cellules plasmatiques. Dans la plupart des cas, ces nodules sont assez rapidement envahis par des polynucléaires et forment de petits abcès (2).

On peut ainsi produire, par l'introduction de corps étrangers dans le tissu conjonctif, des infiltrations chroniques formées de cellules plasmatiques et contenant des plasmodies, qui, suivant l'allure plus ou moins aiguë ou torpide de la réaction, rappellent la structure des plasmomes produits par la tuberculose, la syphilis, les sporotrichoses, la morve, etc. (3).

(1) Voir Maximoff, *Ziegler's Beiträge*, 1902, 1903, 1904, 1905.

(2) Gougerot et Vaucher, *J. de médecine int.*, 30 avril 1909.

(3) Voir Gougerot, Th. Paris, 1908 ; — De Beurmann et Gougerot, *Ann. de dermatologie*, 1907. — De Beurmann, Gougerot et Vaucher, *S. méd. des hôpitaux*, 11 octobre 1907 et 22 mai 1908.

Certaines substances insolubles injectées dans un but thérapeutique produisent aussi des nodules inflammatoires chroniques. Les suspensions fines de mercure métallique dans les corps gras (huile grise) peuvent être utilisées pour ces expériences ; le mercure s'y trouve à l'état de gouttelettes métalliques dont les plus petites sont de la grosseur d'un globule rouge. On fait l'injection dans les masses musculaires sacro-lombaires du lapin (1). Le premier effet de ces injections est un appel de polynucléaires; en même temps, la réaction du tissu conjonctif se traduit par une hypertrophie des cellules conjonctives. Cette réaction aboutit, en l'espace d'un mois environ, à la formation d'un nodule ou tubercule dont le centre ramolli est formé surtout par les grains de mercure et les polynucléaires ; ce noyau central est entouré d'une zone où les cellules conjonctives sont hypertrophiées et où le tissu conjonctif est modérément infiltré de cellules plasmatiques. Cette zone périphérique, en quelques mois, se transforme en une coque fibreuse qui entoure le nodule ramolli et dégénéré dans lequel les grains de mercure paraissent subsister un temps extrêmement long (2).

Les corps gras qui servent d'excipient à l'émulsion de mercure ou à tout autre corps inoculé dans un but expérimental ont une destinée très différente suivant leur nature. Les matières grasses d'origine animale ou végétale (oléine, lanoline, axonge, etc.) sont phagocytées et assimilées par les leucocytes dans lesquels on les retrouve à l'état de gouttelettes colorables par l'acide osmique (3). Les hydrocarbures au contraire (vaseline, huile de vaseline, paraffine) restent à l'état de corps étrangers dans les tissus pendant un temps illimité (4). Ils ne semblent pas produire par eux-mêmes des réactions inflammatoires bien accusées ; ils ne sont pas attaqués par les leucocytes.

L'injection de substances irritantes a été souvent faite dans un but thérapeutique pour provoquer la formation d'abcès dits *de fixation* (5). A ce sujet la réaction produite par les injections d'essence de térébenthine a été bien étudiée au point de vue expérimental. L'injection de carbures liquides (pétrole, benzène, etc.) produit des effets analogues (6). Ces corps sont insolubles dans l'eau. Ils se comportent comme des corps étrangers. Inattaquables par les ferments cellulaires, ils sont facilement éliminés. Ils produisent une attraction de leucocytes polynucléaires et une réaction intense du tissu conjonctif qui se manifeste par le gonflement, la mobilisation et la multiplication des cellules conjonctives. Celles-ci les englobent à l'état de gouttelettes colorables par le rouge soudan en coloration vitale. Plus

(1) Brissy, Th. Paris, 1908.

(2) Les leucocytes n'arrivent donc pas à les faire disparaître et leur persistance a quelquefois causé, chez l'homme, des accidents d'intoxication (voir Ménétrier et Bouchaud, *S. méd. des hôpitaux*, 22 juin 1906). Le mercure semble absorbé très lentement à l'état de sel soluble.

(3) Les phénomènes d'assimilation de la graisse peuvent se poursuivre pendant plusieurs mois.

(4) Brissy, Th. Paris, 1908 ; — Fauré-Frémiet, *Bull. de la Soc. de méd. légale de France*, 7 juillet 1919, et *Ann. d'hygiène publique et de médecine légale*, mai-juin, 1920 ; — Jacob et Fauré-Frémiet, *Revue de chirurgie*, 1917.

(5) Carles, Th. Bordeaux, 1902; — Casedevant, Th. Paris, 1913.

(6) Fauré-Frémiet, *Annales d'hygiène publique et de médecine légale*, mai-juin 1920. L'injection de substances caustiques (acides, bases fortes, etc.) produit surtout des effets nécrosants.

tardivement, on voit se former des cellules géantes, aux dépens des cellules conjonctives (1).

Si les corps étrangers introduits sont des substances nutritives, non irritantes, (fragment de viande cuite, blanc d'œuf, fibrine cuite, etc.), ces substances sont incorporées par les leucocytes et plus ou moins assimilées ; la réaction inflammatoire est nulle ou extrêmement réduite. Le cas de la fibrine est particulièrement intéressant : le caillot de fibrine est pénétré par les leucocytes polynucléaires et aussi par les cellules conjonctives qui s'y ramifient et la remplacent peu à peu par du tissu conjonctif véritable.

Part de la diapédèse et de la réaction des cellules fixes dans l'inflammation du tissu conjonctif sous-cutané. — Comme celles qui sont faites sur les membranes péritonéales, les expériences que nous venons de rapporter montrent que dans l'inflammation du tissu conjonctif sous-cutané, il existe deux phénomènes d'ordre différent qui évoluent en même temps : un apport de leucocytes sanguins, une réaction des éléments fixes. Si la réaction est vive, l'afflux des leucocytes polynucléaires sanguins est si abondant qu'il masque la réaction des cellules fixes ; il se produit un abcès. Dans les cas où l'irritation est moins vive, la réaction des cellules fixes est visible, elle se traduit par une hypertrophie du noyau et du protoplasma; l'affinité de ce dernier est plus grande pour les couleurs basiques ; ces cellules se multiplient et acquièrent un pouvoir phagocytaire considérable, phénomènes analogues à ceux que nous avons examinés pour les cellules endothéliales des séreuses. Les cellules endothéliales vasculaires subissent une réaction semblable (2). Ces cellules fixes, irritées et modifiées, incorporent les polynucléaires et sont les agents de la réparation. Il n'existe aucune différence fondamentale entre la réaction des cellules endothéliales et celle des véritables cellules conjonctives.

Les cellules adipeuses perdent leur graisse, leur protoplasma se gonfle et elles se transforment en éléments arrondis à large protoplasma. Elles peuvent subir une multiplication de leurs noyaux et former des cellules géantes (3).

(1) La plupart de ces expériences ont été faites chez les Mammifères dont les réactions tissulaires sont vives. Des expériences analogues peuvent être réalisées chez les Batraciens. Chez la grenouille, on utilise les sacs lymphatiques ou la cavité péritonéale dont les membranes sont des objets favorables. Chez les Urodèles (triton, axolotl), on pratique des incisions et des cautérisations de l'expansion membraneuse de la queue. On choisit de préférence des espèces peu pigmentées (voir Maximoff, *Ziegler's Beiträge*, XXXIX, 1906).

(2) La cellule de Kupffer ou cellule endothéliale des capillaires veineux du foie montre des réactions analogues. Voir M. Nathan, Th. Paris, 1908.

(3) Darier et Roussy, *Archives de méd. exp.*, XVIII, 1906.

La majorité des lymphocytes que l'on trouve dans les inflammations moins aiguës proviennent d'une diapédèse sanguine, plus lente, et qui succède à celle des polynucléaires. Un grand nombre de ces lymphocytes se transforment sur place en cellules plasmatiques. Quelques-uns sont capables de former directement des cellules éosinophiles et des mastzelles. Beaucoup d'auteurs admettent la transformation des lymphocytes et des plasmazelles en éléments conjonctifs lors de la phase de réparation, mais le fait n'est pas encore prouvé. La disparition d'un grand nombre de cellules plasmatiques par dégénérescence ou nécrose est au contraire facile à observer.

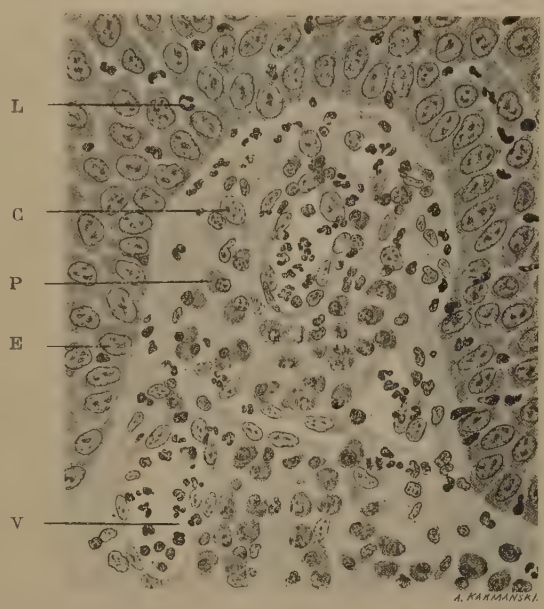


Fig. 229. — Peau de la lèvre au voisinage d'une plaque muqueuse syphilitique. Coupe perpendiculaire à la surface et sectionnant une papille suivant son grand axe.

L, leucocyte polynucléaire cheminant entre les cellules épidermiques ; — *C*, cellule conjonctive ; — *P*, cellule plasmatique — *E*, cellule épidermique ; — *V*, vaisseau sanguin contenant des polynucléaires et des lymphocytes 420 diam.

Eosinophilie locale. — L'afflux des leucocytes polynucléaires est toujours accompagné de la diapédèse de quelques leucocytes à granulations éosinophiles venus aussi du sang des vaisseaux. Les leucocytes éosinophiles sont beaucoup plus abondants dans les réactions chroniques du tissu conjonctif et ils sont particulièrement nombreux, par exemple, au voisinage des kystes hydatiques. On s'est demandé si cette accumulation, cette éosinophilie locale, comme on l'a appelée, résultait entièrement de la diapédèse. Il est certain que les lymphocytes peuvent se transformer directement en leucocytes éosinophiles, et des foyers formateurs peuvent apparaître aussi en différents points du tissu conjonctif, analogues à ceux de la moelle osseuse. Dans l'éosinophilie locale, cependant, on ne voit pas de véritables foyers myéloïdes ; les nouvelles cellules apparues viennent surtout du

sang (1); une partie seulement se forme sur place par transformation directe des lymphocytes. Parmi ces cellules, les unes sont semblables à celles du sang, avec leur noyau bilobé; d'autres sont très différentes; leur taille est plus grande et leur noyau est arrondi (2).

Cellules épithélioïdes. Plasmodies. — On trouve enfin dans les nodules inflammatoires chroniques produits par les expériences ou spontanés, une dernière catégorie d'éléments dont nous devons préciser la nature; ce sont les cellules dites *épithélioïdes* et les cellules géantes ou *plasmodies*.

Les cellules épithélioïdes, qu'on observe, par exemple, dans le follicule tuberculeux, représentent une modification, une dystrophie des cellules conjonctives fixes qui apparaissent fusiformes ou irrégulièrement polyédriques et anastomosées. Elles ne sont pas formées par des éléments diapédésés.

Les plasmodies apparaissent au voisinage de corps étrangers inoculés (3); on les observe dans un grand nombre de lésions et en particulier dans les follicules de la tuberculose bacillaire. Ces éléments se présentent comme des masses globuleuses ou irrégulières contenant parfois un nombre considérable de noyaux ovalaires de même taille, qui dans la plasmodie du follicule tuberculeux sont presque toujours rejetés à la périphérie (4).

(1) En instillant dans l'œil d'un cheval de la toxine ascaridienne, Weixberg et Seguin (*S. de Biologie*, 17 mai 1913) provoquent un œdème de la paupière avec forte infiltration de leucocytes éosinophiles sanguins, qu'on voit apparaître d'abord dans les capillaires, puis dans le tissu conjonctif. L'éosinophilie sanguine peut être elle-même sous la dépendance de métaplasies myéloïdes disséminées (voir Widal et Faure-Beaulieu, *J. de Physiologie*, IX, 1907).

(2) Voir Sabrazès, M. Léger et A. Léger, *Réunion biologique de Bordeaux*, 6 décembre 1910. Ces éléments à noyau arrondi sont distincts des plasmocytes à corps de Russell et des cellules éosinophiles à noyau pycnotique. Ces faits sont exceptionnels; la majorité des leucocytes éosinophiles contenus dans le tissu conjonctif normal et enflammé sont des leucocytes migrateurs venus du sang (voir p. 298).

(3) On les obtient très facilement dans les expériences. On les voit aussi chez l'homme dans les plaies de guerre, au voisinage des débris de vêtement entraînés (voir Policard et Desplas, *S. de Biologie*, 17 février 1917).

(4) La plasmodie n'est pas un élément caractéristique de la lésion tuberculeuse; seule sa situation dans le follicule et la disposition particulière de celui-ci sont à peu près spéciales à la tuberculose bacillaire. Les plasmodies apparaissent régulièrement autour des corps étrangers difficilement résorbables, volumineux ou insolubles qui ont été inoculés. On peut les voir apparaître aussi, formés de la même manière aux dépens des éléments conjonctifs, au contact des cristaux formés dans ce tissu (cristaux de cholestérine, cristaux de Charcot). On peut aussi trouver, dans l'intérieur des plasmodies, des cristaux en aiguille disposés en sphères radiées, dont la formation est probablement contemporaine de la constitution de la plasmodie. Ces sphéro-cristaux sont probablement formés de cholestérine (voir Ernst, *Ziegler's Beiträge*, LIII, 1912; Herxheimer et Roth, *Ziegler's Beiträge*, LXI, 1916; Roussy, *S. de Biologie*, 5 juillet 1913).

Des éléments très différents semblent capables de former ces masses nucléées. Les cellules géantes qui apparaissent au voisinage de corps étrangers inoculés résultent presque toujours de la transformation des cellules conjonctives. Les cellules adipeuses peuvent aussi leur donner naissance (1). Elles rappellent les myéloplaxes, que nous étudierons plus loin et qui sont un état plasmodial des ostéoblastes. Les plasmodies des follicules de la tuberculose bacillaire semblent être formées de même par une transformation, une dystrophie de la cellule conjonctive (2). Enfin, les cellules épithéliales elles-mêmes peuvent, dans certains cas, former des masses plasmodiales analogues ; elles ne sont pas rares dans les épithéliomas (3) ; on en trouve dans la phase d'involution des organes lympho-épithéliaux (4). Elles peuvent se former aussi bien que plus rarement aux dépens des épithéliums de revêtement (5). Dans l'inflammation du tissu conjonctif sous-cutané, les cellules adipeuses irritées et modifiées donnent lieu aussi à l'apparition d'éléments géants et multinucléés (6) ; il en est de même des cellules endothéliales vasculaires (7.)

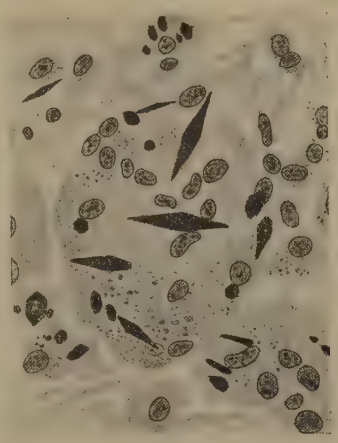


Fig. 230. — Cristaux de Charcot contenus dans des masses plasmodiales au voisinage d'un foyer de nécrose du tissu lymphoïde, dans une rate surnuméraire. 400 diam.

La manière dont prennent naissance ces plasmodies n'est pas absolument élucidée. On n'y observe jamais de mitoses multiples comme dans les mégacaryocytes de la moelle, de l'aire vasculaire et du foie embryonnaire. Elles ne peuvent résulter que de la division directe des noyaux (amitose) sans division du protoplasma ou de la fusion de cel-

(1) Darier et Roussy, *Arch. de méd. exp* , 1906.

(2) Dans le tubercule bacillaire, dont l'histogénèse a été si discutée pendant de longues années, la réaction des cellules fixes et la diapédèse interviennent toutes les deux. La réaction des éléments fixes donne surtout les cellules épithélioïdes et les cellules géantes ; les cellules plasmatiques proviennent de la transformation des lymphocytes émigrés ; il est possible qu'un certain nombre de ces lymphocytes se forment sur place. Voir sur cette question Dominici et Rubens-Duval, *Archives de méd. exp.*, XVIII, 1906.

(3) Delamare et Lecène, *Archives de méd. exp.*, XVIII, 1906.

(4) Voir ch. xv et Jolly, *Archives d'an. micr.*, 1915.

(5) Voir Hecht, *Ziegler's Beiträge*, XLVIII, 1910 ; — Alezais et Peyron, *Réunion biologique de Marseille*, 15 mars 1910.

(6) R. Marie, *Congrès int. de médecine*, Paris, 1900. *Section d'an. path.*, p. 78.
Darier et Roussy, *Archives de méd. exp.*, XVIII, 1906.

(7) Melnikow-Raswedenkow, *Ziegler's Beiträge*, 1901, Suppl. 4, p. 1.
Brosch, *Virchow's Archiv*, CXLIV, 1896.

lules voisines. Les deux modes existent probablement. La division directe des noyaux ne s'y fait pas sous forme d'un étranglement ou d'un étirement ; les noyaux semblent subir une sorte de fissuration. La formation de ces plasmodies apparaît comme l'expression d'un trouble de nutrition, précédant souvent une phase de nécrose. Cette dystrophie est précédée d'un stade de grande activité où la masse plasmodiale possède, comme les cellules conjonctives irritées dont elle provient, un pouvoir phagocytaire considérable.

Fig. 231. — Paroi d'hydrocèle. Masses plasmodiales, P, formées autour d'un cristal de cholestérine, C, dissous par les réactifs. 470 diam.

Étude des sérosités, du tissu conjonctif et des cellules lymphoïdes par la méthode des cultures « in vitro ». — Les relations génétiques qui existent entre les différentes cellules de la lymphe et du tissu conjonctif ont été aussi étudiées depuis longtemps à l'aide de la méthode des cultures *in vitro*. Si on recueille dans une chambre humide de la sérosité péritonéale de grenouille ou de mammifère et qu'on l'examine à la température convenable, on voit certaines cellules lymphoïdes arrondies pousser lentement de très longs pseudopodes et s'immobiliser dans cette forme arborisée qui rappelle absolument celle des cellules conjonctives et endothéliales des membranes enflammées. Il est très facile de fixer ces éléments et d'obtenir des préparations persistantes (1). D'autres cellules lymphoïdes s'étalent sur le plateau de la chambre humide, s'accolent par leurs bords ; elles figurent, dans ces conditions, une sorte d'endothélium. Ces modifications appartiennent aux grosses cellules lymphoïdes à noyau arrondi de la sérosité péritonéale, c'est-à-dire à des éléments analogues aux cellules endothéliales gonflées et mobilisées. Elles n'appartiennent ni aux leucocytes polynucléaires ni aux leucocytes éosinophiles ; les petits lymphocytes ne les montrent pas non plus.

En employant la méthode des cultures de *Carrel* (2), pour l'étude du tissu conjonctif et du tissu lymphoïde, *Maximoff* (3) a cherché à suivre la différenciation *in vitro* des cellules lymphoïdes. Il ensemence sur plasma du même animal de petits fragments de la substance corticale de ganglions lymphatiques du lapin. Il observe l'émigration de grosses cellules qui poussent des prolongements et qui

(1) Voir ch. I et ch. V. — Voir Ranvier, *C. R. de l'Ac. des sc.*, 6 avril 1891 ; — Jolly, *Archives de méd. exp.*, 1898.

(2) La méthode consiste essentiellement à ensemencer de très minimes fragments de tissu dans du plasma autogène obtenu par centrifugation et coagulé, et contenu dans des boîtes de Gabritschewski. Voir Carrel, *Presse méd.*, 1910.

(3) Maximoff, *Réunion biologique de Pétrograd*, 15 et 29 novembre 1916 et *Archives russes d'anatomie, d'histologie et d'embryologie*, 1916.

appartiennent aux éléments conjonctifs du réticulum (1). Quant aux lymphocytes, un certain nombre d'entre eux se transforment en cellules plasmatiques, mais si quelques-uns d'entre eux grossissent, on ne les voit pas *in vitro* se transformer en cellules à prolongements étoilés, arborisés. Jusqu'ici, la méthode n'a donc pas permis de constater la transformation d'un petit lymphocyte en cellule conjonctive et le problème reste en suspens. Par contre, en ajoutant à la culture de l'extrait de moelle osseuse, pour l'activer, *Maximoff* a observé, *in vitro*, la transformation de lymphocytes en cellules semblables aux myélocytes granuleux.

Fig. 232. — Lymphe péritonéale de la grenouille rousse conservée *in vitro* pendant 24 heures. Fixation *in situ*. Cellules libres d'aspect lymphoïde qui ont poussé de longs prolongements et se sont transformées en cellules conjonctives. 400 diam.

Fig. 233. — Homme. Coupe de poumon atteint de bronchopneumonie. Cellule épithéliale pulmonaire, libre dans l'alvéole et en caryocinèse. 875 diam.

Inflammation des muqueuses. Réaction des cellules épithéliales de revêtement. — Les cellules épithéliales qui revêtent les cavités du corps, présentent, au cours des réactions inflammatoires, des phénomènes qui rappellent beaucoup ceux que présentent les cellules conjonctives endothéliales. L'exemple le plus frappant est celui qui concerne l'épithélium des alvéoles pulmonaires. Comme l'ont montré depuis longtemps *Cornil* et *Ranvier* (2) et comme l'ont confirmé plus récemment les travaux de *Cornil* et de ses élèves (3) entrepris avec les méthodes modernes, les cellules endothéliales pulmonaires, dans les pneumonies spontanées ou expérimentales, perdent leur forme aplatie, se gonflent et desquament (4). On les trouve libres, entourées de leucocytes, dans l'alvéole ; elles ont acquis un pouvoir phagocytaire considérable et un grand nombre d'entre elles contiennent des grains de pigment

(1) Cellules réticulaires, que l'auteur considère comme identiques aux cellules migratrices au repos du tissu conjonctif lâche. Elles représentent beaucoup plutôt des éléments de même ordre que les cellules endothéliales des sinus.

(2) Cornil et Ranvier, *Manuel d'histologie pathologique*, 2e éd., II, 1884.

(3) Cornil, *Archives de méd. exp.*, 1897 ; — Cornil et R. Marie, *Archives de méd. exp.*, 1897. — J. C. Briscoe, *J. of Pathology*, XII, 1908.

(4) Ces réactions appartiennent seulement aux petites cellules, les grandes plaques endothéliales sans noyau restant passives (Bozzolo et Graziadei, *Archives italiennes de biologie*, III, 1883).

sanguin et de charbon. Les « macrophages » de l'alvéole pulmonaire enflammée sont donc des cellules épithéliales modifiées et non point des éléments sanguins diapédésés. La plupart de ces cellules sont destinées à disparaître; quelques-unes survivent, présentent des phénomènes de caryocinèse et sont les agents de la réparation de l'épithélium pulmonaire.

Phénomènes réparateurs consécutifs à l'inflammation. — Dans les expériences faites sur l'épiploon, les phénomènes réparateurs sont avant tout l'œuvre des cellules endothéliales qui sont restées à la surface de la membrane; elles poussent, comme nous l'avons vu, des prolongements considérables, s'anastomosent avec leurs voisines et forment un réseau qui se resserre et reconstitue un revêtement continu. Pendant cette phase de leur évolution, les prolongements de beaucoup de ces cellules s'accolent aux filaments de fibrine qui se trouvent à la surface de la membrane et forment des *fibres synaptiques* (1) qui se rétractent progressivement. Les cellules conjonctives font de même. Dans les points où l'exsudat fibrineux accole la membrane aux parois de l'abdomen, les fibres synaptiques passent d'un côté à l'autre. Dans l'épaisseur de la membrane fibrineuse apparaissent ensuite des fibrilles conjonctives; en ce point se produisent des adhérences plus ou moins persistantes. Ces fibrilles paraissent résulter de la transformation des fibres synaptiques. Bien que la question soit encore discutée, elles paraissent se former d'abord dans l'intérieur du protoplasma des prolongements cellulaires, qui résorbent la fibrine et se nourrissent à ses dépens (2).

Les leucocytes polynucléaires, en tant qu'éléments anatomiques, ne jouent aucun rôle dans ces phénomènes réparateurs. Ils sont dévorés et servent de matériel nutritif. Les taches laiteuses contribuent à la réparation par leurs cellules conjonctives et leurs cellules de *Ranvier*. Il est probable aussi que, comme l'admet *Dominici*, leurs cellules d'aspect lymphoïde sont capables de se transformer en cellules conjonctives. Quant à la transformation des lymphocytes sanguins en cellules conjonctives, elle ne peut être encore considérée comme démontrée. La réparation est avant tout l'œuvre des éléments fixes et non celle des éléments émigrés.

Des faits semblables peuvent être observés dans l'étude expérimentale des pleurésies adhésives et des thromboses vasculaires. Les expériences de *Vermorel* (3) sur la plèvre sont, à ce sujet, très caractéristiques. Chez un chien anesthésié, en s'entourant de précautions aseptiques rigoureuses, on fait pénétrer une aiguille courbe dans un espace intercostal de manière à embrocher le poumon; un fil est passé et la ligature faite sur le plan musculo-cutané de l'espace. Après 24 heures, les deux plèvres accolées par la ligature sont unies par une mince couche de fibrine exsudée du plasma sanguin. Les cellules endothéliales, comme on s'en aperçoit sur les coupes, sont gonflées, hypertrophiées et parfois dressées en palissade comme les cellules d'un épithélium cylindrique. Au bout de 48 heures, elles poussent des prolongements qui s'accolent aux filaments de fibrine et s'anastomosent. Dès ce moment, ces cellules se multiplient par division directe et par caryocinèse et parcourent l'épaisseur de la membrane fibrineuse. Elles forment

(1) Ranvier, *C. R. de l'Académie des sciences*, 1er mars 1897, 24 janvier et 7 février 1898, et *Archives d'an. micr.*, II, 1898; — Cornil, *Arch. de méd. exp.*, 1897, *Bull. de l'Acad. de médecine*, 16 mars 1897 et *Presse médicale*, 24 mars 1897.

(2) Voir ch. xi, la question du développement de la fibrille conjonctive.

(3) Vermorel, Th. Paris, 1898.

des néo-vaisseaux. Ceux-ci paraissent donc résulter, non seulement de pointes d'accroissement parties des anciens vaisseaux, mais de la canalisation de cordons cellulaires indépendants formés par les cellules conjonctives endothéliales. Enfin, vers le 8e jour apparaissent des fibrilles conjonctives qui constituent au 20e jour une adhérence solide, cicatricielle. Pendant cette évolution, le réseau de fibrine se désagrège et, après avoir servi de support aux prolongements des cellules conjonctives, il leur sert de matériel nutritif. Des fragments de fibrine, aseptiques, lavés dans l'eau bouillie pour les débarrasser des globules rouges, et introduits dans la cavité pleurale, se fixent sur une des plèvres et sont pénétrées par les cellules conjonctives endothéliales et transformés rapidement, ne laissant comme trace qu'un épaississement de la membrane (1).

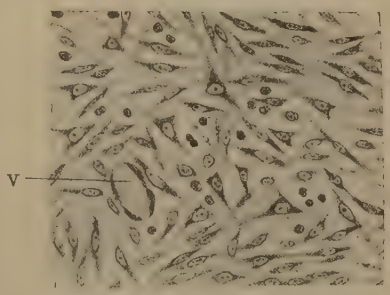


Fig. 234. — Adhérence pleurale après ligature aseptique costo-pulmonaire chez le chien. Coupe de l'exsudat fibrineux organisé, après 5 jours. Réseau cicatriciel formé par les cellules conjonctives, endothéliales et sous-endothéliales anastomosées.

V, néo-vaisseau. 220 diam. D'après Vermorel

L'étude expérimentale des péritonites et péricardites adhésives montrera des faits semblables (2). C'est aussi par le même mécanisme que s'organisent les caillots dans les vaisseaux thrombosés : le tissu qui envahit le caillot est formé par des cellules conjonctives parties de l'endothélium vasculaire ; ce sont elles qui forment les néo-capillaires qui le parcourent et qui rétablissent la perméabilité des vaisseaux obturés (3). Dans toutes ces expériences, le rôle réparateur, édificateur, appartient à la cellule fixe ; la diapédèse ne joue qu'un rôle accessoire ou problématique. Les leucocytes polynucléaires n'interviennent ici que comme matériel nutritif ; peut-être jouent-ils un certain rôle dans la fibrinolyse. Quant aux lymphocytes émigrés, on ne les voit pas intervenir avec évidence. Mais si leur transformation en fibroblastes n'est pas encore absolument démontrée, ils peuvent probablement former dans certains cas des cellules lymphoïdes germinatives aptes à se multiplier et à former du tissu lymphoïde. *Dominici* et *Rubens-Duval* (4) ont vu, dans la paroi de certains abcès, dans le tissu conjonctif enflammé, apparaître du tissu lymphoïde avec des centres germinatifs véritables. Il est certain qu'au cours des réactions inflammatoires, les types cellulaires sont capables de transformations morphologiques beaucoup plus considérables qu'à l'état normal et qu'à ce sujet, la réaction inflammatoire rappelle l'état embryonnaire, qui montre les aptitudes évolutives extrêmes de la cellule mésenchymateuse. Sous des aspects très divers, les cellules mésenchymateuses, fibroblastes, cellules endothéliales, cellules adipeuses, cellules

(1) Vermorel, *l. c.*

(2) Cornil, *Arch. de méd. exp.*, 1897, et *Congrès de méd. Paris*, 1900.

(3) Cornil, *J. de l'anatomie*, XXXIII, 1897 ; — Cornil et R. Marie, *Congrès int. méd. Moscou*, août 1897 ; — Duplay et Lamy, *Archives gén. de médecine*, novembre 1897 ; — R. Marie, *XIIIe Congrès int. médecine*, Paris, août 1900, *C. R. section d'an. path.* ; — Vlassof, *Congrès int. de médecine*, Paris, 1900.

(4) Dominici et Rubens-Duval, *S. de Biologie*, 18 décembre 1909.

pigmentaires, clasmatocytes, cellules osseuses, cellules lymphoïdes, etc., sont des éléments de la même famille aptes à des transformations très étendues (1). Dans l'inflammation, ces éléments ne sont pas toujours capables de s'adapter à ces conditions d'existence nouvelles et précises, d'où l'apparition de dystrophies, dont les cellules épithélioïdes et surtout les cellules géantes sont l'exemple le plus banal (2).

Dans les adhérences conjonctives qui se produisent entre deux surfaces muqueuses, les cellules épithéliales n'interviennent pas dans le phénomène, qui se fait aux dépens des cellules conjonctives sous-épithéliales. Dans l'organisation de l'exsudat fibrineux de la pneumonie, il en est certainement ainsi ; mais les faits sont plus difficiles à élucider. *Cornil* (3) pensait que ce sont les cellules endothéliales transformées qui organisent l'exsudat fibrineux, comme dans les thromboses vasculaires. Il semble cependant difficile d'admettre que les cellules de revêtement de l'alvéole pulmonaire puissent fabriquer du tissu conjonctif ; il est infiniment probable que l'organisation de la fibrine est ici le fait des cellules conjonctives sous-endothéliales et périvasculaires.

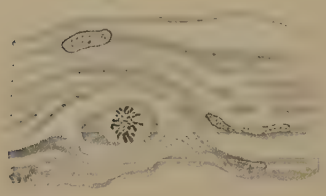


Fig. 235. — Lapin. Coupe de la paroi conjonctive réactionnelle autour de grains vermillon injectés sous la peau 15 jours avant. Mitose d'une cellule conjonctive. 650 diam.

Réparation des plaies. — L'étude expérimentale des pleurésies et péritonites adhésives permet de comprendre facilement les phénomènes qui se produisent dans la cicatrisation des plaies. L'expérience peut être réalisée par des incisions aseptiques de la peau ou de la cornée du lapin, faites avec un bistouri bien tranchant (4). Entre les lèvres de l'incision apparaît d'abord un exsudat fibrineux, provenant du plasma interstitiel ; puis l'épiderme, glissant dans l'intervalle, y forme tout de suite un pansement protecteur qui s'accroît ensuite par multiplication cellulaire, et sous lequel va se former la cicatrice dermique plus lente. Celle-ci est due à l'activité des cellules conjonctives qui s'hypertrophient et poussent des prolongements ; ceux-ci s'avancent sur les filaments de fibrine et forment des fibres synaptiques. La rétraction de ces fibres affronte les lèvres de la plaie ; la réunion est complétée plus tard par la formation de fibrilles conjonctives. Les mêmes faits peuvent se voir chez l'homme au niveau des réunions cutanées par première intention. Les leucocytes diapédésés ne jouent dans ces phénomènes qu'un rôle tout à fait accessoire (5).

(1) Voir ch. XI. Dans l'inflammation, il est probable que les cellules des taches laiteuses, les cellules de Ranvier, les cellules périvasculaires sont capables de former sur place des cellules lymphoïdes véritables. A ce sujet, les taches laiteuses et le tissu conjonctif péri-vasculaire ont à peu près la même signification. Voir Herzog, *Ziegler's Beiträge*, LXI, 1916.

(2) Rubens-Duval, Th. Paris, 1908.

(3) Cornil, *XIIIe Congrès int. méd.*, Paris, 1900 ; — Voir aussi Cornil et R. Marie, *Archives de méd. exp.*, 1897.

(4) Ranvier, *Archives d'an. micr.*, II, 1898 ; — Jolly, *S. an.*, 1895, 1897, 1898 ; — Branca, Th. Paris, 1898.

(5) Les phénomènes qui se passent dans les greffes de tendons faites par Nageotte *C. R. Ac. des sc.* et *Soc. de Biologie*, 1916 et 1917) sont tout à fait comparables à l'organi-

Dans les plaies septiques où la réunion n'a pas été obtenue immédiatement, la cicatrisation épidermique ne se produit pas ; la réparation part de la profondeur pour aller vers la surface. Si la plaie est anfractueuse et dénudée, il se produit un phénomène nouveau : la formation de bourgeons charnus qui comblent la cavité. Ces bourgeons sont formés essentiellement par des anses vasculaires parties de vaisseaux préexistants et qui s'avancent vers la surface ; ces néo-vaisseaux sont entourés d'un tissu conjonctif très lâche, infiltré de leucocytes polynucléaires, de leucocytes éosinophiles et de lymphocytes diapédésés. Ces derniers, à la base des bourgeons, se transforment partiellement en cellules plasmatiques. Mais ici encore, ces éléments migrateurs ne jouent qu'un rôle accessoire, et le rôle édificateur appartient surtout aux cellules conjonctives péri-vasculaires, aux éléments fixes et non aux éléments diapédésés (1).

EXSUDATS. CYTO-DIAGNOSTIC

Les faits que nous venons d'étudier vont nous permettre de comprendre ce qui se passe dans les exsudats des cavités séreuses qui apparaissent chez les animaux et chez l'homme sous l'influence de différentes causes pathologiques.

Ces exsudats peuvent se présenter sous plusieurs aspects : ils sont louches, purulents ou bien transparents, séreux. Parmi ces épanchements séreux, les uns coagulent lentement, spontanément : c'est le cas des pleurésies séro-fibrineuses. Les autres ne sont pas coagulables spontanément, mais ils contiennent cependant du fibrinogène et des albumines coagulables (ascite, hydrothorax). Bien qu'ils dépendent souvent de lésions qui gênent la circulation veineuse (cardiopathies, cirrhoses, etc.), on ne peut les considérer simplement comme une sorte d'œdème de la cavité ; il est plus juste de penser qu'à cette transsudation hydropique s'ajoute un élément inflammatoire très atténué.

Les épanchements purulents sont formés par un liquide spontanément coagulable très riche en fibrine et qui contient en suspension un nombre considérable de leucocytes polynucléaires. C'est l'abondance plus ou moins grande de ces leucocytes qui donne à ces épanchements leur aspect plus ou moins franchement purulent.

A côté de ces épanchements purulents et séreux, il faut placer les exsudats hémorragiques et les exsudats opalescents ou lactescents.

sation du caillot de fibrine. Dans les greffes de Nageotte, le tendon a subi l'action d'un fixateur ; il est pénétré par de jeunes cellules conjonctives et le tissu ancien est remplacé fibre à fibre d'une manière telle que l'architecture primitive est exactement conservée. Pour Nageotte, dans la cicatrisation des plaies par première intention, les fibrilles de fibrine sont capables de se transformer directement en fibrilles conjonctives, Cf. Nageotte, *l'Organisation de la matière dans ses rapports avec la vie*, Paris, 1922. Voir aussi ch. XI.

(1) Dans le bourgeonnement *normal* des plaies, Policard et Hauser (*S. de Biologie*, 9 mars 1918), admettent qu'il n'y a jamais de plasmocytes.

L'étude microscopique de la composition cellulaire des exsudats des cavités séreuses date des travaux de *Widal* et de ses élèves (1). Cette composition varie suivant leur nature, d'où un précieux élément de diagnostic dont la clinique a bénéficié. La méthode est connue sous le nom de *cytodiagnostic* (diagnostic des épanchements par la nature de leur composition cellulaire).

Exsudats pleuraux. — Cette méthode a d'abord été mise à profit pour l'étude des exsudats pleuraux.

Au cours d'une ponction évacuatrice ou exploratrice de la plèvre, on recueille quelques centimètres cubes d'exsudat. Ce liquide est défibriné par agitation dans un flacon contenant des perles de verre, et centrifugé. Le liquide surnageant est décanté au moyen d'une pipette. On ne laisse au fond du tube que la petite quantité de liquide nécessaire pour délayer le culot, ce qu'on fait avec un fil de platine ou une pipette dont la pointe a été fermée à la lampe. Une gouttelette est portée sur une lame et étalée par un mouvement circulaire. On laisse dessécher ; on fixe et on colore par les méthodes usuelles (2).

L'aspect des préparations varie beaucoup suivant la nature de l'épanchement. Dans l'hydrothorax qui survient sans infection apparente, comme une sorte d'œdème, chez des malades atteints d'albuminurie ou de lésions cardiaques, les éléments anatomiques sont surtout constitués par des cellules endothéliales desquamées. A côté de cellules globuleuses isolées, on rencontre des éléments plus volumineux, à contours polycycliques formés par le groupement de plusieurs cellules endothéliales. Ces volumineuses cellules sont faciles à reconnaître ; elles paraissent exister presque seules au début de la formation de l'épanchement. Plus tard, en même temps qu'on observe, dans un certain nombre d'entre elles, des altérations, on voit affluer des lymphocytes et quelques polynucléaires dont le nombre peut être assez considérable dans le cas de congestion pulmonaire et surtout d'infarctus. Ces poussées de polynucléaires sont du reste fugaces ; ces pleurésies restent séro-fibrineuses et ne deviennent pas purulentes (3).

Dans les pleurésies séro-fibrineuses dites *a frigore* dont les recherches cliniques et expérimentales ont montré dans plus de la moitié des cas la nature tuberculeuse, le résultat est différent. Ici, le liquide est beaucoup plus chargé de fibrine ; il se coagule spontané-

(1) Widal et Ravaut, *S. de Biologie*, 30 juin et 22 décembre 1900 ; — Ravaut, Th. Paris, 1901.

(2) Voir ch. I. La défibrination entraîne un certain nombre de cellules, mais les résultats ne sont pas modifiés.

(3) Barjon et Cade, *S. de Biologie*, 22 juin 1901 et *Arch. gen. de méd.*, 25 juillet 1902.

ment, bien qu'assez lentement; mais, lorsque quelques heures après la ponction, on le filtre sur une toile et qu'on l'exprime, on recueille un caillot de couleur rosée, saumonée, teinte due à la présence de globules rouges (1). Les préparations obtenues avec le culot de centrifugation montrent presque uniquement des lymphocytes et des hématies. Dans les premiers jours, on rencontre quelques polynucléaires et de grosses cellules endothéliales globuleuses, à noyau arrondi; mais ces éléments disparaissent assez vite : une couche de fibrine, rapidement formée, empêche les cellules endothéliales de tomber dans la cavité pleurale (2). Cette néomembrane n'existe pas dans les hydropleurites des brightiques et des cardiaques où la présence d'un liquide abondant est elle-même la cause d'une irritation secondaire de l'endothélium qui prolifère et desquame.

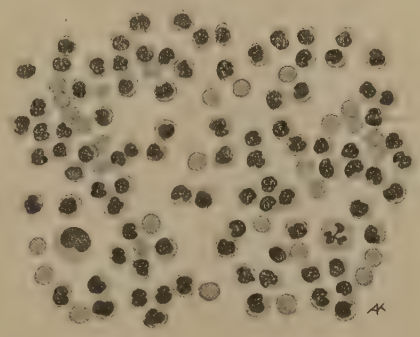


Fig. 236. — Liquide pleural dans la pleurotuberculose. Présence presque exclusive de lymphocytes mélangés à des globules rouges. D'après Widal.

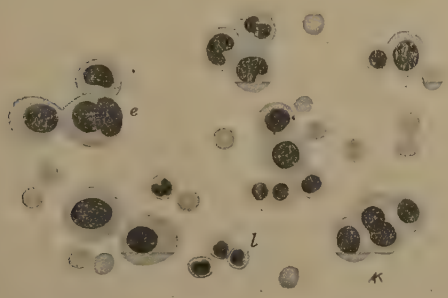


Fig. 237. — Épanchement pleurétique aseptique chez un brightique.
Placards endothéliaux (*e*), globules rouges et lymphocytes (*l*). D'après Widal.

Dans les pleurésies séro-fibrineuses qui surviennent chez les phtisiques, le liquide, qui contient peu ou pas de fibrine, ne renferme que des lymphocytes et des polynucléaires altérés ; on n'y trouve pas de cellules endothéliales.

Dans les épanchements séro-fibrineux consécutifs aux inflammations septiques de la plèvre et qui contiennent toujours beaucoup de fibrine, on trouve des leucocytes polynucléaires abondants, mélangés à des cellules endothéliales ; ces dernières sont d'autant plus nombreuses

(1) Dieulafoy, *Manuel de pathologie interne.*
(2) Cette règle souffre quelques exceptions ; on a cité des pleurésies séreuses où les cellules endothéliales prédominaient et où l'inoculation du culot avait provoqué la tuberculose. Lafforgue, *S. de Biologie*, 23 avril 1910.

que l'examen est pratiqué à une période plus rapprochée du début. Le type des inflammations aiguës de la plèvre est la pleurésie pneumococcique métapneumonique. Si l'épanchement reste séreux, les polynucléaires diminuent progressivement, phagocytés par les cellules endothéliales et quelques lymphocytes apparaissent. Si l'épanchement a tendance à devenir purulent, ce qui est ici le cas le plus fréquent, les polynucléaires affluent de plus en plus.

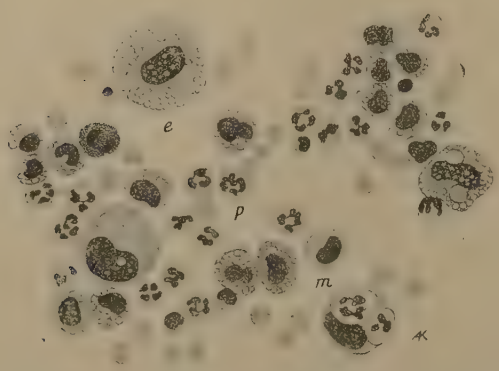


Fig. 238. — Pleurésie pneumococcique séro-fibrineuse. Les leucocytes polynucléaires *p* dominent ; — *e*, cellule endothéliale ; — *m*, macrophage (cellule endothéliale) ayant phagocyté deux polynucléaires. D'après Widal.

Les épanchements séreux que l'on observe pendant le cours de la fièvre typhoïde, du rhumatisme aigu, etc., contiennent, à côté de globules rouges nombreux, des polynucléaires, des lymphocytes et des cellules endothéliales plus ou moins soudées en placards. Les épanchements qui accompagnent les congestions pulmonaires ont la même composition ; il en est de même des épanchements consécutifs aux lésions de voisinage du foie ; dans le cas des abcès du foie, les polynucléaires contenus dans l'épanchement pleural sont assez nombreux.

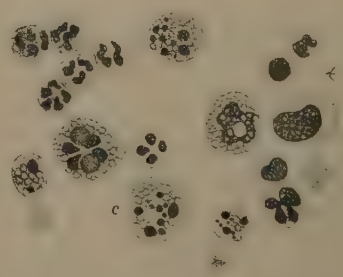


Fig. 239. — Pleurésie séro-fibrineuse pneumococcique. Figures de caryolise, *c*. D'après Widal.

Les épanchements causés par la présence de noyaux néoplasiques pulmonaires sous-pleuraux contiennent aussi, en dehors des hématies, souvent très abondantes, des cellules endothéliales, quelques polynucléaires, des lymphocytes, et en général, pas de cellules éosinophiles. Parmi ces éléments, on distingue parfois de grosses cellules épithéliales néoplasiques ; mais la confusion est facile avec les cellules endothéliales et la présence de figures de caryocinèse permet seulement de supposer la nature néoplasique de l'épanchement ; elle ne permet pas de l'affirmer.

On a signalé, au cours d'affections diverses (syphilis, fièvre typhoïde, tuberculose, etc.) des épanchements pleuraux séreux contenant, à côté de cellules endothéliales, de lymphocytes et de polynucléaires, des leucocytes éosinophiles (1). Dans la majorité des cas, ces leucocytes ont les caractères des leucocytes éosinophiles du sang avec leur noyau géminé spécial ; parfois cependant, leur noyau est arrondi. Cette éosinophilie pleurale ne s'accompagne pas nécessairement d'une éosinophile sanguine ; le sang peut être normal. On a attribué la présence de ces leucocytes éosinophiles, soit à une attraction élective, soit à une formation *in situ* de ces éléments dans l'épaisseur de la plèvre. Dans la leucémie myélogène, on peut observer des épanchements à myélocytes parfois riches en mastzelles (2) ; la présence de ces éléments dans le liquide pleural est en rapport avec des altérations analogues du sang et des tissus.

Il est facile de comprendre la raison de l'aspect différent de ces épanchements séreux en se reportant aux expériences que nous avons relatées plus haut. Ici encore, la réaction première appartient aux cellules endothéliales dont quelques-unes tombent dans l'épanchement. Presque en même temps, affluent par diapédèse les polynucléaires sanguins, qui dans les réactions aiguës, septiques, sont rapidement très abondants. Dans les pleurésies tuberculeuses primitives, la réaction, au début, est du même ordre, mais elle est moins vive, elle devient vite chronique et elle est représentée par les lymphocytes, dont la présence est la manifestation d'une inflammation chronique ou subaiguë de la séreuse. Enfin, la formation rapide d'une néo-membrane empêche la desquamation des cellules endothéliales. Dans les hydropleurites, la présence, en nombre souvent considérable, de cellules endothéliales, représente une réaction inflammatoire très atténuée.

Dans ces différentes types d'épanchements, l'attraction chimiotactique élective joue certainement un rôle moins important qu'on ne l'a cru pendant longtemps. La diversité d'aspect s'explique en général plus simplement. Expérimentalement, il est très difficile d'obtenir des épanchements à leucocytes déterminés.

(1) Widal et Ravaut, *S. de Biologie*, 30 juin 1900.
Widal et Faure-Beaulieu, *S. méd. des hôpitaux*, 13 juillet 1906 et *J. de Physiologie*, IX, 1907 ; — Barjon et Cade, *Archives gén. de médecine*, 1903 ; — Burnet, Th. Paris, 1904. L'éosinophilie pleurale a été observée aussi dans l'hémothorax traumatique. Chastenet de Géry, Th. Paris, 1904 ; Sacquépée, *Gaz. hebd.*, 1902 ; Dieulafoy, *Manuel de pathologie interne*. L'éosinophilie pleurale coïncide fréquemment avec une éosinophilie sanguine, mais le fait n'est pas constant. Pour expliquer l'éosinophilie pleurale on a incriminé la chimio-taxie élective, la formation sur place des leucocytes éosinophiles et enfin une fabrication plus intense des cellules éosinophiles dans l'ensemble des tissus hématopoïétiques.

(2) Ehrlich, *XIIIe Congrès int. de médecine*, Paris, 1900 (*Sec. anat. path.*).

Ce qui domine, dans la plupart des exsudats expérimentaux, ce sont les leucocytes à noyau polymorphe. Quand la réaction est subaiguë, les leucocytes éosinophiles et les lymphocytes apparaissent. Les injections de suspension d'aleurone donnent des épanchements riches en polynucléaires (1). On a obtenu parfois des épanchements riches en éosinophiles par l'injection de suspensions de globules rouges dans l'eau salée (2).

Dans les pleurésies septiques dues à la présence de microbes pyogènes (pneumocoque, streptocoque, etc.), l'épanchement devient le plus souvent purulent ; les polynucléaires augmentent rapidement de nombre puis dominent presque exclusivement. Un grand nombre de ces leucocytes ne tardent pas à montrer les altérations protoplasmiques et surtout nucléaires que nous avons étudiées. Dans certains épanchements purulents aseptiques consécutif à la pneumonie, et qui ont une tendance naturelle à la guérison, *Widal et Gougerot* (3) ont signalé, comme un caractère distinctif, l'intégrité des leucocytes polynucléaires.

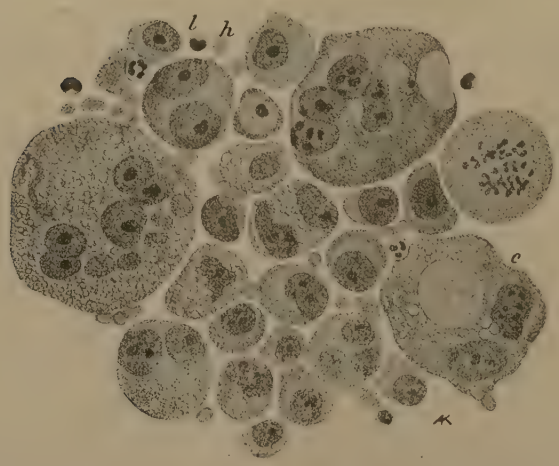


Fig. 240. — Pleurésie cancéreuse. Remarquer la taille gigantesque des cellules néoplasiques (*c*) comparée à celle des polynucléaires (*p*), lymphocytes (*l*) et hématies (*h*). D'après Widal.

Exsudats péritonitiques. — Des faits analogues se voient dans l'étude des épanchements abdominaux. L'ascite des cirrhotiques, peu ou pas spontanément coagulable, contient surtout des cellules endothéliales desquamées, auxquelles se joignent un certain nombre de leucocytes polynucléaires. Dans les ascites d'origine cardiaque ou rénale, on voit les mêmes faits. Dans l'ascite de la péritonite tuberculeuse, on constate, de plus, la présence de nombreux lymphocytes. Mais il ne se forme pas de fausse membrane comme au niveau de la plèvre ; les cellules endothéliales, bien que souvent peu nombreuses, existent toujours dans l'épanchement.

(1) Tarassewitsch, *Ann. Pasteur*, XVI, 1902.
(2) Stschastnyi, *Ziegler's Beiträge*, XXXVIII, 1905.
(3) Widal et Gougerot, *S. med. des H.*, 27 juillet 1906.

L'analyse microscopique ne donne donc pas ici, au point de vue du diagnostic de la tuberculose, des renseignements aussi précieux que pour les exsudats pleuraux (1).

Dans des cas de kyste hydatique, on a signalé la présence des leucocytes éosinophiles (2) ; et dans la leucémie myélogène, on a parfois observé des épanchements à myélocytes (3). Dans les péritonites aiguës, à tendance suppurative, ce sont naturellement les polynucléaires qui dominent. Dans les péritonites cancéreuses, aux éléments exprimant la réaction subaiguë (cellules endothéliales, hématies, polynucléaires, lymphocytes) peuvent s'ajouter, comme dans la plèvre, de grosses cellulles néoplasiques parfois reconnaissables (4).

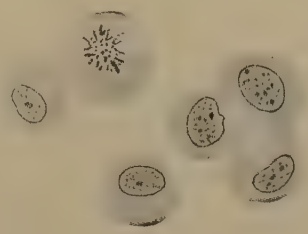


Fig. 241. — Ascite cirrhotique. Cellules endothéliales libres ; l'une d'elles est en mitose. 665 diam.

Il existe enfin des épanchements ascitiques dont le liquide a un aspect bien spécial : il est lactescent (5). Ces ascites lactescentes ont été considérées comme dues au mélange du chyle à l'épanchement abdominal, et dans quelques cas, on a pu démontrer à l'autopsie la réalité d'une fistule chyleuse au niveau du canal thoracique ou d'un chylifère (6). Mais il n'est peut-être pas nécessaire d'admettre ces fistules pathologiques pour expliquer la pénétration du chyle dans la cavité abdominale et il est possible que les éléments du chyle transsudent ici à travers la paroi des chylifères. On a publié aussi des observations dans lesquelles le liquide d'aspect lactescent ne contenait qu'une proportion minime de graisse, mais présentait seulement au microscope de très fines granulations, non colorables par l'acide osmique, semblables à celles que l'on trouve dans le sérum opalescent ou lactescent de certains albuminuriques (7).

La distinction entre ces ascites non chyleuses et les véritables ascites chyleuses est souvent difficile. La recherche des leucocytes peut donner d'utiles renseignements. Dans les ascites chyleuses, on trouve parfois de nombreux leucocytes : ce sont en majorité des lymphocytes auxquels se joignent quelques grosses cellules à noyau arrondi ; on n'y voit pas de polynucléaires (8). La composition cellulaire de l'épanchement est ainsi la même que celle de la lymphe du canal thoracique.

L'étude des épanchements articulaires, du liquide d'hydrocèle, etc., permet de faire des observations analogues à celles qu'offre l'étude des épanchements pleuraux et abdominaux. La réaction aiguë septique se manifeste surtout par l'afflux des polynucléaires, la réaction subaiguë et chronique par la prédominance des lymphocytes comme on le voit dans la tuberculose testiculaire ; les cellules endothéliales dominent dans les épanchements hydropiques.

(1) Cade, *Archives de méd. exp.*, XVIII, 1906.
(2) Tebbutt et Welsh, *The Lancet*, 1910.
(3) Milchner, *Zeitschrift f. klin. Medicin*, XXXVII, 1899.
(4) Regaud, *Congrès de méd.*, Lyon, 1894 ; — Cade, *Archives de méd. exp.*, XVIII, 1906.
(5) Letulle, *l'Inflammation*, Paris, 1893 ; — Bargebuhr, *Deutsches Archiv f. klin. Medicin*, LIV, 1895.
(6) Straus, *Archives de physiologie*, 1886.
(7) Achard, *S. méd. des hôpitaux*, 13 novembre 1896 ; — Widal et Sicard, *S. méd. des hôpitaux*, 6 novembre 1896 ; — Haushalter, *Réunion biologique de Nancy*, 8 mars 1910.
(8) Widal et Merklen, *Presse méd.*, 24 février 1900.

Liquide céphalo-rachidien. — Les modifications pathologiques du liquide céphalo-rachidien, à cause de leur importance clinique, méritent une mention spéciale. Le liquide céphalo-rachidien normal, retiré par ponction lombaire, est incolore et clair comme de l'eau. Il ne contient pas d'éléments figurés ou renferme seulement quelques rares lymphocytes. Dans les méningites cérébro-spinales, dues à divers microbes septiques et au méningocoque, le liquide devient louche ; il contient de nombreux leucocytes polynucléaires. Les lymphocytes réapparaissent lorsque la maladie entre dans une phase moins aiguë (1). Dans la méningite tuberculeuse, l'exsudat est surtout formé par des lymphocytes, auxquels s'ajoutent quelques polynucléaires (2). Un exsudat à lymphocytes se voit aussi au cours de la paralysie générale, du tabes, de la sclérose en plaques, de la méningite syphilitique, de la pachyméningite cervicale, dans les tumeurs cérébrales, les accidents saturnins, le zona et dans tous les cas où les lymphocytes infiltrent les méninges (3). Les résultats négatifs obtenus par l'examen du liquide céphalo-rachidien peuvent donc avoir une grande importance pour le diagnostic du tétanos et des divers délires *sine materia* occasionnés, par exemple, par les maladies infectieuses ; car, dans ce cas, le liquide ne contient, en général, pas de leucocytes.

La lymphocytose du liquide céphalo-rachidien est un signe précoce, durable, et d'importance capitale pour le diagnostic de la paralysie générale et de la syphilis des centres nerveux (4). Elle manque le plus souvent dans l'épilepsie, l'alcoolisme et les psychoses constitutionnelles (5). Dans les hémorragies méningées, spontanées ou traumatiques, on observe à côté des hématies, des cellules volumineuses endothéliales, des lymphocytes et des polynucléaires (6). Dans les cas de cancer généralisé aux centres nerveux et aux méninges, on a parfois mis en évidence des cellules néoplasiques dans le liquide (7).

Lorsque, dans le liquide céphalo-rachidien, l'exsudat est abondant, il suffit d'étaler sur une lame une goutte de liquide et les procédés de fixation et de coloration usuels permettent de reconnaître facilement la présence des leucocytes. C'est ce qui arrive, par exemple, dans le cas du liquide louche ou purulent des méningites aiguës septiques. Dans les méningites chroniques à liquide clair, au contraire, le nombre des éléments cellulaires est si peu élevé qu'il est nécessaire, non seulement de centrifuger le liquide, mais de prendre quelques précautions spéciales. On centrifuge le liquide à étudier dans un tube effilé, ou bien on le

(1) On a signalé des cas exceptionnels avec lymphocytose persistante et d'autres dans lesquels les éléments cellulaires, constitués surtout par des polynucléaires, sont très rares ; il s'agit alors ici en général de cas graves mortels.

(2) Widal, Sicard et Ravaut, *S. de Biologie*, 13 octobre 1900 et *Presse médicale*, 17 octobre 1900. Exceptionnellement, les polynucléaires peuvent dominer. On a signalé des cas où le liquide céphalo-rachidien ne contient que très peu de cellules.

(3) Nageotte, *Société médicale des hôpitaux*, 25 janvier 1901 ; — Sicard et Monod, *S. méd. des hôpitaux*, 18 janvier 1901 ; — Achard, *Gaz. hebd. de médecine et de chir.*, 21 juillet 1901. A la suite des accidents apoplectiformes, ou à la suite d'injection de médicaments dans le canal rachidien, on peut voir apparaître de la polynucléose.

(4) Widal, Sicard et Ravaut, *S. méd. des hôpitaux*, 18 janvier 1901 ; — Monod, *S. méd. des hôpitaux*, 18 janvier 1901 ; — Seglas et Nageotte, *S. méd. des hôpitaux*, 7 juin 1901 ; — Babinski, *S. de neurologie*, 5 mars 1903 ; — Babinski et Nageotte, *Soc. med. des Hôpitaux*, 24 mai 1901.

(5) Voir Barbé, *Examen des aliénés*, Paris, 1921.

(6) Voir Froin, Th. Paris, 1904.

(7) Widal et Abrami, *S. méd. des hôpitaux*, 28 février 1908. Voir aussi Widal, Lemierre et Boidin, *Soc. méd. des hôpitaux*, 22 juin 1906.

laisse déposer, dans une pipette effilée, mais tenue verticalement pendant 24 heures. Après centrifugation ou sédimentation, le liquide est décanté brusquement. Le tube, au fond duquel il ne reste que le culot, est tenu renversé ; on y introduit l'extrémité d'une pipette dont la pointe aspire le dépôt. Une petite goutte du dépôt est déposée sur une lame, on laisse sécher sans étaler ; on fixe par l'alcool absolu et on colore par les méthodes usuelles.

Le liquide céphalo-rachidien pouvant contenir, à l'état normal, 2 ou 3 lymphocytes par mm.c., on peut donc, à la rigueur, par centrifugation, obtenir un dépôt avec un liquide normal. Aussi a-t-on essayé d'avoir une approximation plus grande, en numérant les lymphocytes. Immédiatement après la ponction, on colore le liquide céphalo-rachidien en y ajoutant une goutte de violet de méthyle (1). On aspire un peu du liquide coloré avec une pipette bien propre et on dépose une goutte dans une chambre à numération. Les chambres humides graduées employées pour la numération des hématies et des leucocytes peuvent être utilisées (2). Cependant, le volume de liquide qu'elles permettent d'analyser est en général trop faible. On emploiera de préférence la cellule de *Nageotte*, de 0 mm. 5 de profondeur, qui permet de passer en revue une quantité de liquide beaucoup plus grande (3). Chacun des champs de numération correspond à 1 mm.c. 25 ; on compte les lymphocytes contenus dans huit champs de numération et on divise par 10.

Exsudats cutanés. Liquide des vésicules et des bulles. — Les leucocytes contenus dans le liquide des vésicules épidermiques et des phlyctènes sont en général formés par des polynucléaires. Peu abondants dans les liquides séreux, leur nombre augmente avec la tendance de l'exsudat à passer à la suppuration (4). Dans un certain nombre de cas, des leucocytes éosinophiles s'ajoutent aux polynucléaires ; c'est ce qu'on voit dans l'eczéma, l'herpès, l'impétigo, la sérosité du vésicatoire (5). En général, peu nombreux, ils peuvent au contraire, dans diverses dermatites bulleuses (pemphigus, dermatite de Duhring), former la majorité des cellules de l'exsudat (6). Dans la variole suppurée, le liquide purulent des pustules peut contenir, comme le sang, à côté de nombreux polynucléaires, un certain nombre de myélocytes (7). Le même fait a été observé dans le liquide du vésicatoire appliqué chez des malades atteints de leucémie myélogène.

Leucocytes contenus dans les sécrétions. Exsudats des muqueuses. — Toutes les sécrétions glandulaires contiennent des leucocytes ; ceux-ci pro-

(1) Si le liquide est rosé, teinté par du sang, on peut y ajouter une goutte d'acide acétique pour détruire les globules rouges.

(2) Voir ch. III.

(3) Nageotte et Lévy-Valensi, *S. de Biologie*, 7 décembre 1907. Voir encore, sur le liquide céphalo-rachidien, Mestrezat, Thèse Montpellier, 1911. Pour les milieux oculaires, qui par certaines de leurs réactions, rappellent le liquide céphalo-rachidien, voir Bruckner, *Archiv f. Ophtalmologie*, C, 1919.

(4) Darier, *Précis de dermatologie* et *Pratique dermatologique* ; — Rubens-Duval, Th. Paris, 1908.

(5) Roger et Josué, *Presse médicale*, 8 mai 1901. Chez l'homme sain, la sérosité du vésicatoire contient environ 20 p. 100 de leucocytes éosinophiles et chez l'homme atteint d'une infection provoquant une polynucléose, ce chiffre tombe et les polynucléaires augmentent.

(6) Leredde et Perrin, *Ann. de dermatologie*, 1895. Cf. aussi Ehrlich, *Congrès int. méd.*, Paris, 1900 ; — Griffon et Abrami, *Soc. med. des Hôpitaux*, 27 juillet 1906.

(7) E. Weil, *S. de Biologie*, 23 juin 1900.

viennent du sang ; ils émigrent dans le tissu conjonctif, traversent les épithéliums de revêtement et tombent dans les acini et les canaux glandulaires. En traversant les épithéliums des muqueuses, les leucocytes arrivent de même dans la cavité du tube digestif ; on en trouve aussi à la surface de la muqueuse du tractus génital, du tractus respiratoire, dans les urines. Ils augmentent de nombre lorsque les muqueuses sont atteintes d'inflammation, et peuvent constituer du pus. Le pus de l'expectoration bronchique, celui de la pyurie, de la blennorrhagie, etc., sont des exemples de ces suppurations. Le pus de la blennorrhagie aiguë est presque entièrement constitué par des leucocytes polynucléaires vivants et mobiles, qui sont arrivés avec rapidité du sang des vaisseaux jusqu'à la surface de la muqueuse. On trouve mélangés à eux, un certain nombre de leucocytes à granulations éosinophiles et de volumineuses cellules à noyau arrondi qui sont des cellules épithéliales gonflées et desquamées.

Leucocytes de la salive. Corpuscules salivaires. — La salive, examinée à l'état frais, sans réactifs, montre toujours un certain nombre d'éléments cellulaires sphériques qui sont des leucocytes altérés. Ils se présentent comme des vésicules transparentes, limitées par une fine membrane et contenant des granulations réfringentes animées d'un mouvement brownien. Ces éléments sont morts et ne présentent pas de mouvements amiboïdes. Le hyaloplasma digéré et liquéfié à l'exclusion des grains, permet à ceux-ci d'être agités d'un mouvement oscillatoire rapide (1). Ces leucocytes sont en majorité des leucocytes polynucléaires, comme on le constate sur les préparations fixées et colorées. Quelques auteurs (2) ont voulu y voir des lymphocytes provenant des amygdales et directement transformés en polynucléaires. Il est plus probable que les corpuscules salivaires viennent des conduits excréteurs des glandes salivaires où il est facile du reste d'aller les chercher ; ce sont des leucocytes sanguins diapédésés. Dans le mucus buccal, on trouve naturellement, en outre, des lymphocytes émigrés au niveau des tonsilles.

Les autres sécrétions du tube digestif contiennent aussi, comme la salive, quelques leucocytes diapédésés ; il en existe aussi en petit nombre dans les conduits excréteurs du pancréas. A la surface de la muqueuse digestive, on trouve de plus des leucocytes polynucléaires et éosinophiles qui ont diapédésé directement, et des lymphocytes qui ont traversé l'épithélium au niveau des organes lymphoïdes (3). Ces différents leucocytes sont rapidement altérés dans le tube digestif et à l'état normal, on ne les retrouve pas. Par conséquent, l'existence d'abondants leucocytes polynucléaires dans les vomissements, dans le mucus des fèces peut faire penser à la présence d'un abcès, d'une ulcération, etc. L'examen histologique du liquide parotidien a été utilisé pour le diagnostic des parotidites et en particulier des oreillons (4).

Leucocytes des voies respiratoires. Exsudats bronchiques. Cra-

(1) Le mouvement brownien des granulations leucocytaires n'existe que lorsque des granulations se trouvent dans le liquide d'une vacuole ou dans un protoplasma liquéfié. Il peut donc se voir sur des leucocytes vivants et mobiles ; mais le phénomène appartient en général à des leucocytes altérés et lorsqu'il est généralisé à toute la cellule, c'est que celle-ci est morte.

(2) Weidenreich, *Folia hæmatologica*, V, 1908.

(3) Voir ch. xv.

(4) Sicard et Dopter, *S. de Biologie*, 18 février 1905.

chats. — La muqueuse des bronches, de la trachée et du larynx contient à l'état normal, une petite quantité de tissu lymphoïde. Les lymphocytes arrivent à la surface de l'épithélium en même temps qu'un certain nombre de leucocytes polynucléaires diapédésés. Ces éléments se retrouvent dans les crachats mélangés à des cellules épithéliales. Celles-ci se présentent avec des aspects différents : les unes sont de grands éléments aplatis, à noyau ovalaire, provenant de l'épithélium pavimenteux stratifié de la bouche et du pharynx. D'autres sont des cellules cylindriques à plateau cilié, provenant des bronches et du pharynx nasal ; elles sont en général très altérées. Enfin, il en est qui sont sphériques, à noyau arrondi et dont le cytoplasme est souvent bourré de pigment sanguin ou de granulations diverses, surtout anthracosiques. Ces cellules, connues depuis longtemps sous le nom de *cellules à poussière* sont des cellules épithéliales de l'alvéole pulmonaire qui ont subi une réaction analogue à celle de l'endothélium des séreuses ; ce ne sont pas des leucocytes. A ces éléments épithéliaux divers s'ajoutent des globules rouges, des lymphocytes, des polynucléaires et des leucocytes à granulations éosinophiles.

La présence, l'abondance, l'association de ces divers éléments dans les crachats peut donner quelques renseignements cliniques (1). Dans le crachat de la pharyngite chronique, riche en mucus, dominent les grandes cellules de l'épithélium pharyngé. Dans les crachats de la bronchite aiguë, riches aussi en mucus, on trouve des cellules bronchiques dégénérées et de nombreux polynucléaires, très abondants à la période de suppuration. Des cellules pulmonaires apparaissent dans les cas où l'inflammation a atteint les alvéoles.

Le crachat pneumonique est caractérisé, au début, par la présence d'un exsudat séro-albumineux qui est distinct du mucus et coexiste avec lui. Il apparaît sous forme de gouttelettes qui prennent avec les bleus basiques une teinte violacée. Le mucus se présente au contraire sous forme de nappes hyalines diffuses colorées en rouge par le bleu polychrome, et encore, sous forme de réseaux fibrillés, surtout visibles dans la période de résolution (2). A ce moment apparaissent en grand nombre des cellules épithéliales alvéolaires et des leucocytes polynucléaires. Dans la congestion pulmonaire aiguë et dans la bronchopneumonie, la composition des crachats est à peu près la même que dans la pneumonie. Dans les crachats hémoptoïques de la congestion pulmonaire passive des cardiaques (induration brune), on trouve, à côté des globules rouges, de nombreuses cellules épithéliales pulmonaires, chargées de pigment sanguin, et qui sont mélangées à du mucus, à des leucocytes et à des gouttelettes de liquide séro-albumineux. L'expectoration de l'œdème aigu du poumon est constituée presque exclusivement par des gouttelettes d'exsudat albumineux et quelques rares cellules alvéolaires et bronchiques. Le crachat d'asthme, sec et adhérent, est formé presque uniquement de mucus hyalin dans lequel on observe des cellules bronchiques et des leucocytes éosinophiles. Ces derniers sont reconnaissables à leur noyau bilobé spécial, à leurs granulations colorables par l'éosine, même dans les doubles colorations éosine-hématéine. On peut trouver, dans les crachats pharyngés, des corps arrondis, réfringents, colorés en rose par l'éosine et non colorables par

(1) De Jong, Th. Paris, 1907.

(2) D'après *de Jong*, ces réseaux et filaments sont tout à fait distincts de la fibrine, nulle ou peu abondante dans les crachats pneumoniques, sauf dans les cas où le malade expectore un moule bronchique.

l'acide osmique, et qui sont probablement formés de leucine et de lipoïdes provenant de la dégénérescence des cellules. Quant aux cristaux de Charcot, on peut les trouver dans les crachats des asthmatiques, en même temps que les leucocytes éosinophiles ; mais ils se voient surtout dans les crachats expectorés depuis quelque temps et qui ont subi des altérations *in vitro*.

Leucocytes du tractus génital. Sédiment urinaire. — Les leucocytes arrivent normalement par diapédèse à la surface de la muqueuse du tractus génital comme à la surface des autres muqueuses. Ce sont surtout des polynucléaires et quelques éosinophiles. Ces éléments ne deviennent très abondants que dans le cas de suppuration pathologique de ces muqueuses. Le pus de la blennorrhagie aiguë contient toujours, comme nous l'avons vu, à côté des polynucléaires, un certain nombre de cellules éosinophiles. Ces divers éléments, arrivés par une diapédèse rapide, ne sont pas morts et présentent pendant quelque temps des mouvements amiboïdes, faciles à voir en diluant légèrement le pus avec de l'eau salée isotonique.

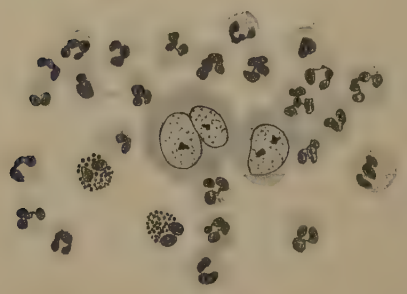


Fig. 242. — Pus de blennorrhagie aiguë. Leucocytes polynucléaires et grosses cellules de l'épithélium uréthral. A gauche, en bas, deux leucocytes à grains éosinophiles. 800 diam.

Dans les urines, à l'état normal, on trouve, dans le sédiment, quelques rares leucocytes polynucléaires. Ces éléments montrent parfois des mouvements amiboïdes; mais en général, le milieu ne convient pas à leur survie et ils y meurent rapidement. Ces leucocytes deviennent naturellement très abondants lorsque l'urine contient du pus (cystites, pyélonéphrites).

Fig. 243. — Homme. Pus blennorrhagique mélangé à une solution NaCl à 7,5 p. 1.000 et observé à la température du laboratoire (23°). Presque tous les leucocytes ont de vifs mouvements amiboïdes. 375 diam.

Leucocytes du colostrum et du lait. — Le colostrum est le liquide sécrété par la glande mammaire pendant la gestation, à partir du 4e ou 5e mois, et pendant les premiers jours qui suivent l'accouchement. C'est une sérosité visqueuse, légèrement opaline, striée de filaments jaunâtres qui, examinée à l'état frais, au microscope, montre des globules de graisse et des éléments figurés. Ces derniers apparaissent sphériques, mûriformes, de coloration jaunâtre, volumineux, d'un diamètre de 10 à 40 μ. Ils ont une tendance à se mettre en amas. Leur protoplasma contient des gouttelettes graisseuses colorables en noir par l'action de l'acide osmique. Ces corpuscules du colostrum ne présentent pas de mouvements propres. A côté d'eux, on observe des éléments plus petits, à protoplasma finement granuleux, et qui à une température de 37°, montrent des mouvements amiboïdes très actifs ; il s'agit là de leucocytes. Pour faire des préparations persistantes, on étale le colostrum en couche mince sur une

lame ; on dessèche rapidement à l'air et on fixe par le mélange alcool absolu-éther qui, dissolvant les gouttelettes de graisse, permet d'obtenir ensuite de bonnes colorations. On peut aussi fixer avant dessiccation par les vapeurs osmiques et traiter ultérieurement par l'alcool-éther pour dissoudre la graisse. Sur les préparations colorées, les gros globules du colostrum montrent un noyau sphérique ou réniforme ; exceptionnellement, on observe deux ou trois noyaux. A côté de ces corpuscules, on distingue des leucocytes polynucléaires typiques, facilement reconnaissables. La plupart sont intacts ; ce sont eux qui présentaient des mouvements amiboïdes dans le colostrum frais ; quelques-uns montrent un noyau en pycnose et fragmenté. L'existence de véritables leucocytes dans le colostrum est donc certaine. On les voit non seulement chez la femme, mais chez les animaux ; ils sont très abondants chez la femelle du cobaye. La nature des gros corpuscules du colostrum a été par contre très discutée, les uns y voyant des cellules épithéliales glandulaires, d'autres des leucocytes ayant phagocyté des grains de graisse. Il ne semble pas douteux aujourd'hui, surtout d'après les recherches histologiques qui ont été faites sur la glande mammaire en lactation (1), que le plus grand nombre de ces éléments correspond à des cellules glandulaires, ou à des portions de cellules glandulaires. Le colostrum contient donc à la fois des leucocytes et des cellules épithéliales (2).

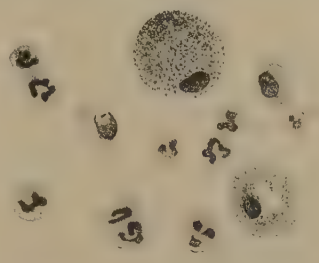


Fig. 244. — Colostrum, 24 heures après l'accouchement. Globules de colostrum et leucocytes polynucléaires.

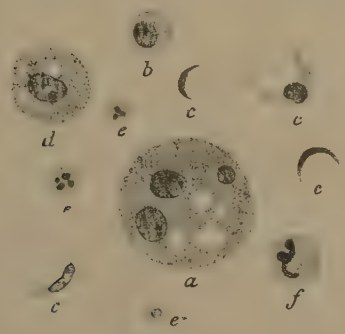


Fig. 245. — Colostrum, 48 heures après l'accouchement. Différents aspects des éléments figurés.

a. gros globule de colostrum à trois noyaux ; — *b*, petit globule du colostrum ; — *c*, *c*, corps en croissants formés aux dépens des globules du colostrum ; — *d*, globule de colostrum caractéristique ; — *e*. *e*, leucocytes à noyau pycnotique ; — *f*, leucocyte polynucléaire contenant des globules de graisse.

Pendant la grossesse, le nombre des leucocytes polynucléaires est très faible ; il est inférieur à celui des globules de colostrum ; après l'accouchement, c'est l'inverse. Dès que l'enfant commence à prendre le sein, les globules de colostrum changent d'aspect : les gouttelettes de graisse remplissent de plus en plus le protoplasma et le noyau, refoulé, prend la forme d'un croissant. Deux ou trois jours après la première tètée, les leucocytes disparaissent et les corpuscules de colostrum diminuent aussi de nombre ; ils présentent des altérations ; vers le 5e ou

(1) Limon, *J. de l'anatomie*, 1902. Les alvéoles glandulaires ne sont tapissés que d'une seule rangée de cellules et, contrairement à ce qui se passe dans les glandes sébacées, la cellule épithéliale, pendant la sécrétion ne se détache pas en entier : sa partie périphérique, distale, contient souvent un noyau dû à une division directe, se détache, tandis que la base, avec le noyau originel, subsiste et reforme toute la cellule.

(2) On trouve parfois de petits globules du colostrum, à noyau arrondi. Ils répondent (peut-être à des lymphocytes ou à des cellules épithéliales de canaux excréteurs desquamées et modifiées.

6e jour, leur nombre devient tout à fait négligeable. Mais chaque fois que l'excrétion du colostrum est peu active, les corpuscules peuvent exister pendant un temps prolongé, alors même que le produit de la sécrétion mammaire a l'aspect du lait véritable.

Fig. 246. — Lait de femme fixé sur lame par l'alcool-éther après dessiccation, et coloré par la thionine. Collerette protoplasmique entourant les plus gros globules de lait.

Dans le lait, on trouve, à côté des gouttelettes de graisse, des *corps en croissant* qui sont des restes de globules du colostrum. Ils disparaissent en général assez vite, avec les autres éléments figurés. Mais il existe dans le lait d'autres corps en croissant, très différents des premiers et qui sont beaucoup plus nombreux et beaucoup plus petits. On les voit sur les préparations fixées par l'alcool-éther et colorées par les bleus basiques. Contrairement aux croissants du colostrum, ils ne prennent pas le vert de méthyle. Si on ajoute une trace de matière colorante au lait frais, on voit que ces petits éléments sont toujours accolés aux globules gras. Il s'agit là vraisemblablement de débris du protoplasma de la cellule glandulaire qui ont été entraînés par les globules gras et qui le recouvrent partiellement ou en totalité. Peut-être sont-ils le support des ferments du lait.

Les leucocytes polynucléaires n'existent qu'en très petit nombre dans le lait normal de la femme. La réapparition des leucocytes polynucléaires dans le lait, alors que l'allaitement n'est pas suspendu, indique en général l'existence d'une infection des canaux excréteurs, d'une galactophorite qui précède souvent l'abcès du sein. Leur présence en nombre appréciable constitue donc un élément intéressant du diagnostic (1).

Fig. 247. — Lait de femme, cinq jours après l'accouchement. Présence de nombreux leucocytes polynucléaires intacts indiquant l'existence d'une infection des canaux galactophores.

Lorsque la femme n'allaite pas, les globules du colostrum persistent pendant tout le temps que dure la sécrétion mammaire. On ne trouve pas d'autres éléments figurés. Si, chez une femme qui allaite, l'allaitement est suspendu, on voit apparaître, vingt-quatre heures après, des globules du colostrum et des leucocytes polynucléaires; ces derniers ne tardent pas à disparaître et les globules du colostrum persistent seuls. Cette transformation du lait en colostrum

(1) Lourié, Th. Paris, 1901. — Marfan, *Traité de l'allaitement*, 3e éd., Paris 1920. — Marfan, Feuillée et Saint-Girons, *S. de Biologie*, 15 novembre 1913.

Voir aussi Wallich et Levaditi, *Annales Pasteur*, XIX, 1905. — Patton, *Rev. méd. de la Suisse romande*, XXV, 1905; — Popper, *Archiv f. d. ges. Phys.*, CV, 1904. — Unger, *Virchow's Archiv*, CLI, 1898; — Cohn, *Virchow's Archiv*, CLXII, 1900; — Donné, *Cours de microscopie*, 1844; — J. Arnold, *Ziegler's Beiträge*, XXXVIII, 1905. La recherche des leucocytes dans le lait de vache peut avoir une certaine valeur pour déceler la présence de germes. Normalement, ce lait renferme des leucocytes, mais en très petite quantité. On fait cette recherche en centrifugeant. On rejette la couche butyreuse et le lait écrémé; puis, avec une pipette effilée, on recueille le culot leucocytaire et on l'étend sur lame (Kufferath, *Annales Pasteur*, XXXIII, 1919).

peut être facilement suivie chez les animaux, en particulier chez le cobaye. Les corpuscules du colostrum apparaissent chaque fois que la sécrétion est ralentie. La persistance des polynucléaires en grand nombre correspond à la rétention du lait et aux phénomènes irritatifs qui l'accompagnent.

CHAPITRE VII

VARIATIONS NUMÉRIQUES DES LEUCOCYTES LA LEUCOCYTOSE. LEUCOCYTES ET IMMUNITÉ LEUCOCYTES ET NUTRITION

Dans le sang, le nombre des leucocytes n'a pas la même fixité que celui des hématies ; il oscille cependant, à l'état physiologique, entre des limites assez étroites, qu'il importe de connaître, afin de pouvoir juger les variations pathologiques, qui concernent à la fois le nombre absolu des globules blancs et la proportion de leurs différentes variétés.

Même à l'état normal, le nombre absolu des leucocytes ne peut être aussi fixe que celui des globules rouges. Ces derniers sont les véritables éléments du sang; en dehors de lui, leur fonction ne peut s'accomplir, et ils sont voués à la destruction. Les leucocytes, au contraire, appartiennent autant au tissu conjonctif qu'au sang ; leur migration est un phénomène normal et ils peuvent jouer leur rôle dans le plasma interstitiel comme dans le plasma sanguin. Dans le torrent circulatoire lui-même, ils ne sont pas tous entraînés avec les hématies et ils s'accumulent dans les points où la circulation est ralentie.

Numération des leucocytes. — La numération des leucocytes du sang se fait par les procédés que nous avons décrits au chapitre III, à propos des globules rouges ; elle exige seulement quelques précautions spéciales. Un observateur exercé reconnaît facilement les leucocytes au milieu des hématies dans le sang dilué avec les liquides conservateurs employés pour la numération. Le plus simple est donc de compter successivement les globules blancs et les globules rouges dans le même mélange. Les leucocytes étant moins nombreux et beaucoup plus disséminés dans la préparation, on passe en revue une surface plus grande et on détermine ainsi leur nombre d'après l'analyse d'un échantillon plus volumineux. Avec l'appareil de Malassez, on passe en revue toute la surface divisée qui correspond à 1 mm. c. du mélange; on compte successivement

les leucocytes dans les bandes transversales formées chacune de dix rectangles. C'est leur réfringence qui permet de reconnaître facilement les leucocytes ; les globules rouges sphériques sont réfringents aussi, mais ils sont colorés et leur éclat est toujours moindre, ce qu'on apprécie immédiatement en mettant au point en surface.

On a proposé de nombreuses formules destinées à colorer les leucocytes dans la dilution. Le plus simple est d'ajouter au liquide formolé de Marcano (voir ch. III), au moment de s'en servir, quelques gouttes d'une solution aqueuse concentrée de violet de méthyle. Dans le mélange, les leucocytes apparaissent uniformément colorés en violet.

On peut aussi utiliser un liquide de dilution qui détruise les hématies et ne conserve que les leucocytes. Le plus employé est une solution aqueuse d'acide acétique à 1 p. 200. On fait donc un mélange spécial pour la numération des globules blancs, à 1 p. 100, 1 p. 50 et même 1 p. 20 ; ces dilutions concentrées permettent de réunir un grand nombre de leucocytes sur une petite surface. Cette méthode peut être employée avec n'importe quel appareil ; les calculs sont faits en conséquence.

Nombre des leucocytes à l'état physiologique. — Chez l'homme, à l'état de santé, le nombre des leucocytes est de 6 à 7.000 par mm.c, soit environ, en admettant un nombre d'hématies de 5 millions : 1500 leucocytes par million de globules rouges, et 1 leucocyte pour 6 à 700 hématies.

Les variations normales sont assez grandes et peuvent aller de 4.000 à 10.000 par mm.c. Ces limites sont même parfois dépassées ; mais des chiffres plus bas et plus forts doivent toujours attirer l'attention. En dehors des causes diverses qui peuvent produire ces variations, le nombre des leucocytes est en général en rapport avec celui des globules rouges ; les sangs peu riches en hématies ont aussi moins de leucocytes, et inversement, ce qui ne constitue pas pourtant une règle.

Chez les nouveau-nés, on trouve souvent des chiffres forts qui coïncident avec un nombre d'hématies dépassant les limites normales. Ces phénomènes sont dus pour une bonne part à la concentration du sang en éléments figurés coïncidant avec la perte de poids que subit l'enfant pendant les premiers jours (1). Mais l'équilibre se rétablit rapidement. Chez le vieillard, les chiffres s'éloignent peu de ce qu'ils sont chez l'adulte (2).

Le nombre normal des leucocytes varie d'une espèce à l'autre. Chez les espèces animales utilisées le plus souvent dans les expé-

(1) Cette perte de poids, habituelle, est due surtout à une perte de liquides et à un jeûne relatif.

(2) Etienne et Perrin, *C. R. de la Soc. de Biologie*, R. B. de Nancy, 10 juillet 1908 et *J. de Phys.*, 1909.

riences (chien, chat, lapin, cobaye), les chiffres s'éloignent peu de ceux qu'on trouve chez l'homme. Chez le rat, le cheval, le bœuf, la chèvre, les leucocytes sont un peu plus nombreux.

Chez les animaux qui, à la naissance, n'ont pas encore le nombre de globules rouges de l'adulte (ch. III et ch. XI), on peut observer dans les premiers temps de la vie, une augmentation progressive des leucocytes analogue à celle des globules rouges. Chez le rat, cette augmentation progressive, toujours plus forte dans le sang périphérique que dans le sang profond, se poursuit jusqu'à l'âge de 6 mois et même de un an (1). Chez le lapin, l'augmentation se poursuit jusqu'à l'âge de 5 à 6 mois, puis le nombre diminue légèrement et se maintient aux environs de 5 à 6.000. Le maximum de la courbe coïncide à peu près avec l'époque de la maturité sexuelle (4 à 5 mois). Les nouveaux leucocytes apparus sont surtout constitués par des lymphocytes (2).

Répartitions des leucocytes dans les différentes parties de l'arbre circulatoire. — Le sang des gros vaisseaux contient moins de leucocytes que le sang périphérique cutané. C'est ce que l'on constate dans presque toutes les expériences et ces différences, très variables, peuvent aller du simple au double (3). D'une manière générale, le sang du cœur, le sang des artères, le sang des grosses veines contient moins de leucocytes que le sang périphérique, cutané, veineux et capillaire.

Ces différences sont en rapport avec les conditions de la circulation ; elles existent là surtout où les actions mécaniques ou vaso-motrices peuvent modifier le cours du sang. On s'en rend bien compte par l'observation directe de la circulation du sang, soit dans le mésentère de la grenouille, soit dans l'aile de la chauve-souris, où, sous l'influence de la stase, on voit se produire, dans des veinules ou dans des capillaires, des accumulations de globules blancs qui peuvent être considérables et qui disparaissent lorsque le sang reprend son cours normal. Ces observations directes expliquent les résultats des numérations dans les expériences où le cours du sang est modifié. Elles sont faciles à réaliser sur l'oreille du lapin : le sang des veines auriculaires, recueilli pendant la stase spontanée ou provoquée mécaniquement, recueilli pendant la vaso-constriction, contient presque toujours un nombre de leucocytes très supérieur à celui que renferme

(1) Jolly, *S. de Biologie*, 5 juillet 1919.
(2) Lindberg, *Folia hæmatologica*, IX, 1910.
(3) Jolly, *S. de Biologie*, 20 juillet 1918.

le sang qui s'écoule abondamment à la suite de la vaso-dilatation, que celle-ci soit spontanée ou artificiellement produite. Le sang des veines auriculaires, même pendant la vaso-dilatation, contient presque toujours plus de leucocytes que le sang de la carotide.

Le sang périphérique, qu'on examine généralement, ne représente donc pas un échantillon d'un liquide homogène. Les leucocytes ne sont pas distribués également dans l'arbre circulatoire. Il y en a toujours davantage là où il y a stagnation du sang. L'accumulation des leucocytes dans les territoires capillaires et les veinules où le sang circule mal, prive momentanément la circulation générale d'une partie de ses leucocytes. Lorsqu'il y a dépression et stase, les leucocytes s'accumulent dans les territoires mal irrigués. Quand la circulation s'accélère, le sang balaie les vaisseaux et fait rentrer dans la circulation générale les leucocytes dont elle avait été privée.

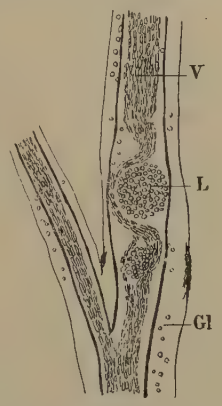


Fig. 248. — Observation de la circulation dans le mésentère de la grenouille (*R. esculenta*). Veine mésentérique dans laquelle la circulation est ralentie et où les leucocytes forment des amas considérables.

V, veine, courant axial formé par les hématies ; — *L*, amas de leucocytes ; — *Gl*, gaine lymphatique.

Ces faits permettent d'expliquer beaucoup de variations de nombre qui ont été observées dans les états physiologiques, soit lorsque la pression sanguine se modifie, soit lorsque le corps change brusquement de position (1). Ils expliquent les modifications de nombre consécutives à des traumatismes divers.

Proportion des variétés de leucocytes à l'état normal. — Les variations numériques des leucocytes, dans les états pathologiques et dans certaines conditions expérimentales, ne concernent pas seulement le nombre absolu de ces cellules dans le sang, mais aussi la proportion des différentes variétés.

Numération des variétés de leucocytes. — Pour évaluer cette proportion, on se sert de préparations de sang étalé sur lame, fixées après dessiccation et

(1) Le passage de la position debout à la position couchée élève chez l'homme le nombre des leucocytes, et inversement, le passage de la position couchée à la station l'abaisse. Ces variations se produiraient même lorsque le changement de position est lent et dépendraient de la position elle-même et non du changement. (Jœrgensen, *R. danoise de Biologie*, 15 avril 1920.)

colorées. La préparatiou est portée sur une platine mobile possédant des mouvements antéro postérieurs et latéraux assez étendus pour pouvoir passer en revue une assez grande surface. Il importe d'avoir des points de repère pour ne pas compter plusieurs fois le même élément. Le champ du microscope étant circulaire, il en résulte que les globules situés aux extrémités de son diamètre équatorial ne passent sous les yeux de l'observateur que pendant un temps très court. Il faut donc se servir d'un oculaire portant un diaphragme rectangulaire ou carré. On se servira, soit des diaphragmes-oculaires de *Malassez* (1), soit de l'oculaire d'*Ehrlich* construit sur le principe des diaphragmes-iris. Ces diaphragmes portent en général un fil transversal qui divise le champ microscopique en deux portions inégales. On fait avancer la préparation dans le sens antéro-postérieur ; on compte les leucocytes au moment où ils dépassent le fil micrométrique et on les répartit en même temps en catégories. Lorsqu'une bande verticale a été ainsi passée en revue, on fait avancer la préparation, dans le sens transversal, d'une quantité égale au diamètre du champ microscopique en prenant comme point de repère un globule blanc ou rouge ; la préparation est de nouveau passée en revue dans le sens antéro-postérieur.

L'exactitude des résultats sera naturellement d'autant plus grande que le nombre des leucocytes passé en revue sera plus grand. L'expérience montre que la proportion peut être établie sur 400 leucocytes. Les résultats obtenus dépendent encore des conditions dans lesquelles le sang a été récolté. Comme nous le verrons plus loin, certaines conditions physiologiques, la digestion, par exemple, sont capables de modifier légèrement le nombre absolu des leucocytes et la proportion de leurs variétés. Ils dépendent enfin de la nature de l'échantillon de sang : chez l'homme, le sang capillaire cutané est assez constant, mais les troubles circulatoires locaux peuvent quelquefois augmenter légèrement la proportion des polynucléaires. Chez les animaux d'expérience, on pourra trouver parfois de légères différences entre le sang profond et le sang périphérique, ce dernier, surtout lorsqu'il y a stase, pouvant contenir une proportion légèrement plus forte de polynucléaires (2). C'est l'inverse qui se produit lors des abaissements leucocytaires dus à des modifications de pression. La proportion des polynucléaires s'abaisse dans le sang périphérique ; les polynucléaires sont plus retenus que les lymphocytes dans les territoires capillaires profonds.

Connaissant le nombre total des leucocytes et la proportion des différentes variétés, il sera facile d'établir le nombre absolu de ces variétés qui, dans certains cas, donne des indications très utiles.

Dans la solution d'acide acétique (1 p. 200) employée pour la numération des leucocytes, le noyau des globules blancs est visible, et il est facile de distinguer les lymphocytes et les polynucléaires. Lorsqu'on sera obligé de faire de nombreuses évaluations de pourcentage, et qu'il suffira de connaître les variations relatives des polynucléaires, on pourra se contenter des numérations directes, à l'hématimètre, moins pénibles que la numération sur préparation colorée. On fait, avec le mélangeur Potain, une dilution de sang au centième ou au cinquantième, dans l'eau acétifiée à 1 p. 200 et on compte tous les globules blancs du champ de numération en les répartissant en variétés (3).

(1) Malassez, *Archives d'an. micr.*, III, décembre 1900.
(2) Jolly, *S. de Biologie*, 20 juillet 1918.
(3) Pagniez et Leobardy, *S. de Biologie*, 27 novembre 1920.

Proportion des différentes variétés de leucocytes chez l'homme. — Chez l'homme adulte, à l'état de santé, le chiffre des polynucléaires est d'environ 60 à 65 p. 100, celui des cellules lymphoïdes, de 32 à 38 p. 100, celui des éosinophiles, de 1 à 2 p. 100 (1).

Voici, par exemple, la moyenne des chiffres obtenus chez de nombreux individus :

	Cellules lymphoïdes	Polynucléaires	Éosinophiles
Adultes de 20 à 45 ans	38,5	60	1,4
Hommes de 70 à 75 ans. . . .	27,7	70,5	1,6
Nouveau-nés de 1 à 10 jours . .	56,7	40,7	2,3

On voit, d'après ce tableau, que le chiffre des polynucléaires est beaucoup moins fort chez le nouveau-né que chez l'adulte et qu'il est un peu plus élevé chez le vieillard que chez l'adulte. Il semble donc qu'au point de vue de sa composition en éléments figurés, le sang subisse une évolution graduelle depuis la naissance jusqu'à l'âge extrême de la vie (2).

Chez les nouveau-nés, pendant les vingt-quatre heures qui suivent la naissance, quelquefois même pendant deux ou trois jours, on peut trouver un chiffre de polynucléaires assez fort, voisin de celui qu'on observe chez l'adulte (voir ch. XI). Le pourcentage indiqué dans le tableau ne semble établi que vers le 6e ou 10e jour ; il persiste pendant la première enfance. Avec des différences individuelles, le chiffre des polynucléaires reste faible pendant les deux premières années de la vie et ne se rapproche de celui de l'adulte que vers 12 à 15 ans (3). Par contre, le pourcentage des éosinophiles a été trouvé un peu plus fort chez l'enfant que chez l'adulte (4).

Les différences concernant le sexe sont peu importantes : on trouve en général, chez la femme, un pourcentage de polynucléaires un peu plus faible que chez l'homme. Les différences individuelles sont peu considérables.

Dans le tableau précédent, nous avons rangé dans la même catégorie tous les lymphocytes, petits et grands, les grandes cellules mononucléaires et les formes à noyau incurvé. L'individualité des grands

(1) Jolly, *S. de Biologie*, 23 octobre 1897 ; — Stiénon, *Ann. soc. des sc. méd. et nat. de Bruxelles*, 1893 ; — Bruhn-Fahreus, *Nordiskt med. Arkiv*, 1897 ; — Ehrlich et Lazarus, *Die Anæmie*, Wien, 1898.

(2) Voir aussi Dobrovici, *S. de Biologie*, 11 juin 1904 ; — Etienne et Perrin, *R. biologique de Nancy*, 10 juillet 1908.

(3) Carstanjen, *Jahrbuch f. Kinderheilkunde*, LII, 1900 ; — Biffi et Galli, *J. de Physiologie*, IX, 1907.

(4) 1 à 6 p. 100 jusqu'à 15 ans d'après les nombreuses observations de Carstanjen.

mononucléaires est moins nette que celle des autres catégories de cellules ; leur nombre est toujours peu élevé (2 à 4 p. 100 chez l'homme normal). Leurs variations numériques ont moins d'intérêt que celle des éosinophiles et surtout que celles des lymphocytes et des polynucléaires.

Morphologie comparée. Pourcentage des variétés de leucocytes chez différents animaux. — Chez les Mammifères, malgré quelques différences, le sang contient des variétés de leucocytes très comparables à celles qui existent dans le sang de l'homme. Le tableau suivant donne, chez des animaux neufs, adultes, quelques moyennes qui pourront servir de terme de comparaison dans les recherches expérimentales (1) :

	Cellules lymphoïdes	Poly	Éosinophiles
	—	—	—
Cobaye	53	46	1
Lapin	57	42	1
Rat	80	19	1
Souris	80	19	1
Chien	23	75	2
Chat	48	48	4
Vache	54	40	6

Les chiffres précédents se rapportent à des animaux adultes ; les différences que nous avons indiquées plus haut suivant l'âge des sujets, chez l'homme, ont été retrouvées aussi chez d'autres mammifères (2).

Les leucocytes à granulations basophiles, les mastzelles, sont en général rares. Chez l'homme, leur nombre ne dépasse guère 0,2 à 0,5 p. 100. Elles sont peu nombreuses chez le chien et le cobaye; elles ne semblent pas exister dans le sang du chat, de la souris et du rat (3). Chez le lapin, ces cellules sont assez nombreuses (2 à 5 p. 100) (4); il en est de même chez le porc (5).

Chez les Oiseaux, on trouve en général une proportion assez forte

(1) Voir aussi Tallqvist et Willebrand, *Skand. Arch. f. Phys.*, X, 1900; — Jolly et Acuna, *Archives d'an. micr.*, VII, 1905 ; — Sabrazès, Muratet et Durroux, *Réunion biologique de Bordeaux*, 7 juillet 1908, et *Gazette hebd. des sc. méd. Bordeaux*, 1908; — Gütig, *Archiv. f. mikr. Anatomie*, LXX, 1907; — Utendörfer, *Archiv f. Tierheilkunde*, XXXIII, 1907; — Weidenreich, *Die Leukocyten*, 1911; — Busch and Van Bergen, *J. of med. Research*, X, 1903; — Musser and Krumbhaar, *Folia hæmatologica*, XVIII, 1914.

(2) Bidault, *Archives de méd. exp.*, XVI, 1904; — Du Toit, *Folia hæmatologica*, XXI, 1916.

(3) Maximoff, *Archiv f. mikr. Anatomie*, LXVII, 1906.

(4) Levaditi, Th. Paris, 1902; — Pröscher, *Folia hæmatologica*, VII, 1909.

(5) Jolly et Vallée, *S. de Biologie*, 3 novembre 1906; — Gütig, *Archiv f. mikr. An.*, LXX, 1907.

de lymphocytes qui atteint 50 à 60 p. 100 (1) ; le reste se répartit à peu près également entre les leucocytes granuleux à noyau polymorphe et les grands mononucléaires hyalins. Les mastzelles sont rares. Les chiffres varient suivant les espèces. On peut faire des constatations analogues chez les Reptiles, avec des différences assez grandes d'une espèce à l'autre. Chez les lézards, les leucocytes à granulations acidophiles sont assez nombreux ; les mastzelles ne sont pas rares. Malgré des variations numériques suivant les espèces, le sang des Reptiles ressemble beaucoup à celui des Oiseaux, au point de vue de sa composition en leucocytes.

Chez les Batraciens anoures, ce sont les lymphocytes qui dominent presque toujours. Chez la grenouille, on trouve environ 80 p. 100 de lymphocytes et 15 à 18 p. 100 de polynucléaires. Chez les Urodèles, la proportion des polynucléaires est en général plus élevée ; chez le triton, elle atteint 50 p. 100 et plus (2).

Chez les Poissons, on trouve surtout des lymphocytes, et chez un grand nombre d'espèces, ils dominent presque exclusivement. C'est ce qu'on voit surtout chez les poissons osseux ; quelques espèces possèdent cependant, comme nous l'avons déjà vu (ch. v) des cellules à granulations acidophiles. Ces cellules sont plus répandues dans le sang des Sélaciens, où les lymphocytes dominent encore.

Variations numériques physiologiques. — En dehors de l'âge, les conditions physiologiques dans lesquelles se trouve le sujet sont capables de modifier momentanément le nombre des leucocytes et la proportion des variétés cellulaires. Nous avons vu plus haut l'influence de la stase sanguine qui, dans les territoires capillaires où elle se produit, est capable d'élever momentanément le nombre des leucocytes. La chute de la pression artérielle produite brusquement, chez le chien ou le lapin par une saignée, ou par l'excitation du pneumogastrique ou du nerf dépresseur (chez le lapin), provoque une chute brusque du nombre des leucocytes, souvent considérable et contemporaine de l'abaissement de pression (3). Cette diminution est due à ce que les leucocytes sont retenus dans les portions de l'arbre vasculaire où le sang circule moins bien ; lorsque la pression se relève, ces leucocytes sont de nouveau entraînés ; le chiffre des leucocytes se relève jusqu'à dépasser le chiffre primitif. La propor-

(1) On trouve environ 60 p. 100 de lymphocytes chez le pigeon, chez la poule et 75 p. 100 environ chez le canard. Voir aussi Launoy et Lévy-Bruhl, *Ann. Pasteur*, mai 1914.

(2) Freidsohn, *Arch. f. mikr. An.*, LXXV, 1910.

(3) J. Camus et Pagniez, *S. de Biologie*, 25 janvier et 27 juin 1908.

tion des variétés cellulaires est souvent influencée par ces troubles circulatoires ; en général, le pourcentage des polynucléaires tend à s'élever avec l'augmentation du nombre absolu des leucocytes et inversement (1).

C'est à des causes analogues qu'il faut rapporter les variations brusques du nombre des leucocytes qu'on obtient parfois chez le chien et surtout chez le lapin, par des traumatismes ou par une simple laparotomie aseptique ; ces faits sont avant tout le résultat d'une inégale répartition. Ces expériences permettent de comprendre qu'on puisse parfois observer chez l'homme des modifications en rapport avec des troubles circulatoires locaux. Elles sont cependant assez rares ; pour les produire, il faut des modifications brusques de la circulation ; elles ne sont pas durables. Dans les membres paralysés, chez les hémiplégiques, chez les malades atteints de lésions cardiaques, on trouve généralement peu de différences.

L'altitude, la dépression barométrique ne produisent aucun changement appréciable. La digestion peut produire une augmentation légère et momentanée du nombre des leucocytes ; aussi a-t-on parlé quelquefois d'une leucocytose digestive (2). On l'observe chez l'homme et chez le chien, pendant la période terminale de la digestion, surtout avec une alimentation azotée ; elle s'accompagne en général d'une augmentation des polynucléaires, parfois précédée d'une augmentation des lymphocytes. Bien que cette réaction ne soit jamais très intense, il convient d'en tenir compte en clinique et dans les expériences ; on se mettra à l'abri de cette cause d'erreurs en faisant les prises de sang en dehors de la période digestive.

La menstruation ne produit en général que de légères modifications des leucocytes ; elle provoque parfois une augmentation transitoire et peu considérable ; ces modifications sont en rapport avec l'importance de l'hémorragie et avec l'état de santé habituel du sujet.

L'augmentation du nombre des leucocytes a été plus souvent observée dans la grossesse, et surtout au moment de l'accouchement ; elle s'accompagne d'une légère élévation du pourcentage des polynu-

(1) L'influence de la stase est bien mise en évidence par une expérience de Ranvier (*Traité technique*, 2e éd., 1889). Chez une grenouille, on lie à la base un des poumons de façon à gêner la circulation. Les deux poumons sont ensuite enlevés, étalés, fixés, colorés et montés en préparation persistante. Les capillaires contiennent beaucoup plus de leucocytes dans le poumon dont la circulation a été gênée.

(2) Dupérié, Th. Paris, 1878 ; — Cadet, Th. Paris, 1881 ; — Rieder, *Beiträge zur Kenntniss der Leukocytose*, Leipsig, 1892 ; — Cot, Th. Lyon, 1903 ; — Lassablière et Richet, *S. de Biologie*, 11 mars 1911.

cléaires qui peut exister seule du reste, sans modification du nombre absolu. La réaction s'atténue et disparaît après la délivrance, si les suites de couches sont normales ; elle peut persister s'il y a eu de fortes hémorragies (1). Ces faits peuvent aussi s'observer chez les animaux.

Les efforts physiques, le massage, les traumatismes, peuvent être la cause de variations aiguës et passagères du nombre des leucocytes. Chez le lapin, les efforts violents faits par l'animal qu'on immobilise, l'asphyxie brusque produite par l'occlusion momentanée des narines (2) suffisent à provoquer une augmentation brusque du nombre des leucocytes, conséquence de l'augmentation de pression due aux violents efforts inspirateurs et à la fréquence des impulsions cardiaques qui suit la période d'asphyxie ; la circulation, plus vive, balaie les leucocytes accumulés contre les parois vasculaires, surtout dans les territoires où le cours du sang est ralenti. C'est du moins l'interprétation la plus vraisemblable de ces faits (3).

LA LEUCOCYTOSE

La leucocytose est l'augmentation du nombre des leucocytes du sang qui survient au cours de certains états pathologiques (4). En général aiguë et passagère elle peut être chronique et persister même, dans certains cas, jusqu'à la mort.

Cette réaction comprend des variations numériques quantitatives et des variations qualitatives portant sur la morphologie des leucocytes et sur le pourcentage de leurs différentes variétés. L'augmentation du nombre absolu est variable. Chez l'homme, des chiffres de 12 à 15.000 représentent une réaction légère ; des chiffres de 15 à 25.000 correspondent à une réaction franche et vive ; ces chiffres peuvent être fortement dépassés.

(1) Blumenthal, *Beiträge zur Geburtshilfe und Gynaekologie*, XI, 1907 ; — Rieder, *Leukocytose*, 1892 ; — Rouslacroix et Benoit, *Réunion Biologique de Marseille*, 17 mars 1903 ; — Carton, Th. Paris, 1903.

(2) Le Sourd et Pagniez, *S. de Biologie*, 12 décembre 1908.

(3) Le lapin est particulièrement sensible à ces influences ; ces expériences ne réussissent pas aussi bien avec d'autres animaux.

(4) Les augmentations du nombre des leucocytes, ordinairement brusques, légères et passagères, qu'on observe dans certains cas physiologiques, ont été souvent décrites sous le terme de leucocytose physiologique. Mais ces réactions fugitives et inconstantes ne méritent pas en général cette dénomination. Dans ces dernières années, quelques observateurs ont employé le terme de leucocytose en le faisant synonyme de : état des leucocytes dans le sang et les sérosités, créant, pour désigner l'augmentation de nombre, le terme d'hyperleucocytose. Il est préférable, pour éviter les confusions, de garder au terme de leucocytose son sens originel.

La proportion des variétés leucocytaires est toujours plus ou moins modifiée ; suivant que l'augmentation porte sur les polynucléaires, les éosinophiles ou les lymphocytes, on a distingué plusieurs types de leucocytose.

Polynucléose. — C'est la plus fréquente des leucocytoses. C'est celle qu'on observe dans beaucoup de maladies infectieuses. La proportion des leucocytes à noyau polymorphe augmente notablement et atteint 80 à 90 p. 100 et plus. La seule constatation de cette augmentation peut révéler l'existence d'une leucocytose. Dans certaines circonstances exceptionnelles, le chiffre absolu des leucocytes à noyau polymorphe ne s'élève pas ; seul augmente leur nombre relatif. C'est là une sorte de leucocytose atténuée.

La leucocytose polynucléaire se voit après les hémorragies, au cours des maladies infectieuses et des intoxications, pendant l'évolution des tumeurs malignes, etc.

Hémorragies. — La leucocytose polynucléaire a été observée à la suite des hémorragies. Les causes qui ont provoqué ces hémorragies surtout lorsqu'elles ne sont pas traumatiques, viennent influencer les résultats. Il est souvent difficile, dans les observations cliniques chez l'homme, de dire si la leucocytose est due à l'hémorragie elle-même ou à la cause qui l'a produite. A la suite des saignées expérimentales, on la constate très souvent. Sa constance dépend beaucoup de l'intensité de l'hémorragie. Nulle ou à peu près à la suite des petites pertes sanguines où, lorsqu'elle existe, elle peut dépendre de la plaie et d'une infection surajoutée, on peut la considérer comme constante, en dehors de toute infection, chaque fois que la soustraction du sang a été abondante.

L'intensité de la réaction est en rapport avec la quantité de sang soustraite. Quelquefois elle n'est marquée que par une augmentation de la proportion des polynucléaires avec des chiffres absolus de leucocytes voisins de la normale. Elle peut être précédée d'une diminution brusque du nombre des leucocytes en rapport avec la chute de la pression artérielle (1). Cette diminution, comme dans les expériences que nous avons rapportées plus haut, est due vraisemblablement à la rétention de nombreux leucocytes dans certaines parties de l'arbre vasculaire. Lorsque la pression se relève, les leucocytes sont entraînés dans le courant sanguin et le chiffre des leucocytes se

(1) J. Camus et P. Pagniez, *S. de Biologie*, 27 juin 1908.

relève jusqu'à dépasser le nombre primitif. Ces phénomènes ne sont pas seuls en jeu. L'apparition de globules rouges nucléés, d'hématies à restes nucléaires et de myélocytes indique que les tissus hémopoiétiques interviennent ici. La leucocytose post-hémorragique lorsqu'elle est accusée, a donc la signification d'un phénomène régénérateur.

Infections. — La leucocytose polynucléaire a été observée dans un grand nombre de maladies infectieuses aiguës : pneumonie, érysipèle, suppurations aiguës, appendicite, diphtérie, rhumatisme articulaire aigu, blennorrhagie aiguë, etc. Le nombre absolu des leucocytes oscille dans la grande majorité des cas entre 12 et 20.000. Il est exceptionnel qu'il atteigne ou dépasse 50.000. La proportion des leucocytes à noyau polymorphe augmente notablement, et atteint 80, 90, 95 p. 100. Cette réaction peut exister seule et représente alors une leucocytose atténuée (1).

Dans les maladies infectieuses aiguës qui ont une évolution cyclique, la leucocytose a une marche définie. Dans la pneumonie franche, la leucocytose peut être considérée comme constante et elle est, le plus souvent très marquée (2). Elle apparaît avec l'invasion de la maladie et persiste jusqu'à la défervescence. Elle tombe avec la fièvre dans les cas de résolution rapide normale. Dans les cas de résolution lente, au contraire, la chute de la leucocytose se fait irrégulièrement, comme la chute de la température. On a même signalé dans certains cas une légère ascension de la courbe de la leucocytose la veille de la défervescence, coïncidant avec l'élévation de température qu'on voit souvent à ce moment dans les cas de résolution rapide. Pendant tout ce temps, le chiffre des polynucléaires reste élevé. A la défervescence, les lymphocytes et les éosinophiles reviennent à leur proportion normale. Ils peuvent même, au moment de la convalescence, être plus nombreux qu'ils ne le seront plus tard. Ce fait a été observé dans beaucoup de leucocytoses polynucléaires. Ces variations momentanées ne sont probablement que l'expression des oscillations qui précèdent tout retour à la stabilité. C'est à cette période qu'on peut voir apparaître dans le sang quelques myélocytes.

(1) Jolly, *XIIIe Congrès Int. médecine*, Paris, 1900. Section d'an. path.

(2) L. Stiénon, *Ann. de la Soc. roy. des sc. méd. et nat. de Bruxelles*, IV, 1895 ; — Bruhn-Fahraeus, *Nordiskt med. Arkiv*, 1897 ; — Rieder, *Beiträge zur Kenntniss der Leukocytose*, Leipsig, 1892 ; — Tchistowitch, *Ann. des sc. biologiques de Saint-Pétersbourg*, II, 1893 ; — Lœper, *Archives de méd. exp.*, novembre 1899 ; — Williamson, *Ziegler's Beiträge*, XXIX, 1901.

Dans la fièvre récurrente, la leucocytose polynucléaire a aussi une marche définie : le nombre des globules blancs augmente chez la plupart des malades pendant l'accès et tombe brusquement en dehors des accès (1).

Dans les suppurations aiguës, la leucocytose polynucléaire est toujours très nette. Elle tombe le plus souvent avec la fièvre lorsque le pus s'est fait jour hors du foyer, que ce soit au dehors ou dans la cavité du tube digestif. Elle peut reparaître ensuite, mais d'une manière moins constante, ou moins intense avec le passage de la suppuration à l'état chronique. Elle diminue et finit ordinairement par disparaître lorsqu'un foyer suppuré non ouvert vient à se refroidir et à s'enkyster. Ces données s'appliquent à peu près à toutes les suppurations : adénophlegmons, suppurations pelviennes, périnéphrites, abcès du foie, etc.

Dans les suppurations aiguës, la courbe de la leucocytose suit les oscillations thermiques, mais sans régularité. Lorsque la suppuration reprend après s'être arrêtée, le phénomène est en général marqué à la fois par une ascension thermique et par une poussée de leucocytes.

Dans l'appendicite aiguë, la leucocytose est à peu près constante. Peu accentuée et rapidement revenue à la normale dans les cas où les phénomènes inflammatoires sont peu intenses, elle suit à peu près la marche de la température. Lorsqu'il y a suppuration, la leucocytose augmente, et cette fois, elle peut exister même sans fièvre. Si l'abcès péritonitique se refroidit et s'enkyste, la leucocytose disparaît ordinairement. Lorsqu'il y a péritonite généralisée, la leucocytose peut manquer ou s'abaisser rapidement (2).

Dans l'érysipèle, la leucocytose est inconstante. Elle n'est bien marquée que dans les cas qui s'accompagnent de suppuration. Mais même dans les cas où le nombre des leucocytes est normal, ou peu augmenté, la courbe est jusqu'à un certain point parallèle à celle de la température : le chiffre le plus élevé existe pendant la période fébrile. La courbe s'abaisse souvent avant la température, faisant prévoir la défervescence. La proportion des polynucléaires est augmentée ; c'est un phénomène constant, qui semble indépendant de l'augmentation du nombre absolu des leucocytes. Les polynucléaires diminuent avec la température ; les lymphocytes augmentent alors de nombre, les éosinophiles réapparaissent, la proportion des différentes formes

(1) Ouskow, *Arch. des sc. biologiques de Saint-Pétersbourg*, II, 1893.
(2) Veau, *Archives de médecine des enfants*, VII, 1904 ; — Sihlol, Th. Paris, 1903.

cellulaires subissant ici encore, comme dans la pneumonie, des oscillations, avant de reprendre son équilibre (1).

Dans la diphtérie, la leucocytose est inconstante et en général peu accentuée. Quand elle existe, elle n'est pas nécessairement en rapport avec la courbe de la température. Lorsque le chiffre absolu des leucocytes est normal, il y a souvent une élévation de la proportion des polynucléaires.

La leucocytose polynucléaire peut aussi s'observer dans le rhumatisme articulaire aigu, la grippe, la méningite cérébro-spinale, la rage, la morve, la scarlatine (2). Elle a aussi été signalée, mais d'une manière très inconstante, dans la période secondaire de la syphilis et dans la rougeole. Elle est fréquente dans la tuberculose pulmonaire, surtout à la période de suppuration.

Dans d'autres maladies infectieuses, comme la fièvre typhoïde, la tuberculose aiguë, la leucocytose manque le plus souvent. Ainsi, dans la fièvre typhoïde, on sait maintenant qu'en général, il n'existe pas de leucocytose, et qu'au contraire, souvent même, il existe une diminution du nombre des leucocytes qui, avec des irrégularités se montre pendant toute la maladie. Pendant la période d'état, la proportion des polynucléaires est augmentée, mais elle peut être aussi inférieure à la normale. A la défervescence, ou même plus tôt, elle s'abaisse presque constamment.

Le nombre souvent abaissé des leucocytes, la diminution de la proportion des polynucléaires à la fin de la maladie permettent parfois de constater, d'une façon très évidente, l'apparition d'une leucocytose polynucléaire révélant l'existence d'une complication (escarre, abcès, furoncle) (3).

Tumeurs malignes. — Depuis les premiers travaux de *Hayem* et de ses élèves (4), la leucocytose polynucléaire a été signalée bien des fois chez des malades atteints de tumeurs malignes, particulièrement au cours du cancer de l'estomac. Mais cette réaction est inconstante, ce qui lui enlève beaucoup de la valeur qu'on lui avait d'abord attribuée (5).

(1) Malassez, *Soc. anatomique*, 1873, p. 141; — Chantemesse et Rey, *Soc. de Biologie*, 18 février 1899, et *Presse médicale*, 1er juillet 1899; — E. Rey, Th. Paris, 1899; — Stiénon, *l. c.*, 1896.

(2) Sacquépée, *Archives de med. exp.*, XIV, 1902; — Bezançon et Labbé, *Archives gén. de med.*, 1902.

(3) Courmont et Barbaroux, *J. de physiologie et de path. gén.*, juillet 1900.

(4) Alexandre, Th. Paris, 1887; — Voir aussi Baradulin, *Folia haematologica*, IX, 1910; — Rubinstein, *Zentrablatt f. innere medicin.*, 1907. La polynucléose a été aussi observée chez les animaux atteints de tumeurs malignes. Voir Kabierske, *Folia hæmatologica*, XX, 1915.

(5) Voir Reinbach, *Arch f. klin. Chir.*, XLVI, 1893.

Cirrhoses. — Dans la cirrhose hypertrophique du foie avec ictère chronique, on peut observer une leucocytose avec chiffres absolus de leucocytes peu élevés ou presque normaux, mais avec une augmentation nette et persistante de la proportion des polynucléaires (1).

Anémies. — La leucocytose peut exister dans les anémies. Cependant, dans les anémies qui ne sont pas provoquées par une hémorragie ou par une infection, et, en l'absence de complications, on ne l'observe ordinairement pas. Souvent même, le nombre des leucocytes est diminué, comme le nombre des globules rouges et comme le chiffre de l'hémoglobine, sans qu'il y ait une relation absolument régulière entre les deux phénomènes.

Intoxications. — La plupart des intoxications aiguës peuvent provoquer la leucocytose ; celle-ci peut être observée expérimentalement à l'aide des poisons minéraux, des toxines animales et végétales et des poisons qui provoquent la destruction des globules rouges (chlorate de potasse, pyridine, etc.) ; on l'a vu aussi chez l'homme dans les intoxications accidentelles par le plomb, le sublimé, les poisons du sang, les essences, etc. La colique de plomb peut être accompagnée d'une légère leucocytose.

Lymphocytose. — La lymphocytose a été constatée surtout chez les enfants, en particulier dans la coqueluche (2), où elle est particulièrement nette et constante, dans la syphilis héréditaire précoce. Dans la syphilis acquise, la période secondaire s'accompagne souvent d'une leucocytose polynucléaire. Pendant la période primaire, certains auteurs ont constaté une augmentation des lymphocytes ; mais les résultats sont assez contradictoires. La lymphocytose a été encore observée pendant la convalescence des maladies infectieuses dans les oreillons, le goitre exophtalmique, et dans les anémies graves ; il s'agit souvent ici d'une augmentation de la proportion des lymphocytes sans augmentation du nombre absolu des leucocytes.

L'accès palustre est souvent précédé par un stade d'hypoleucocytose survenant deux ou trois jours avant l'attaque et coïncidant avec l'invasion du sang par le parasite. La leucocytose commence au stade de frisson et persiste jusqu'au stade de sueur. Pendant ce temps, la

(1) Hanot et Meunier, *S. de Biologie*, 26 janvier 1895.

(2) Fröhlich, *Jahrbuch f. Kinderheilkunde*, XLIV, 1897 ; — Meunier, *S. de Biologie*, 22 janvier 1898, et *Archives de méd. des enfants*, 1898.

proportion des lymphocytes et des mononucléaires est augmentée au détriment des polynucléaires.

Enfin, dans la fièvre typhoïde qui s'accompagne, le plus souvent, d'un chiffre normal ou abaissé de leucocytes, la proportion des polynucléaires au début et pendant la période d'état est le plus souvent augmentée ; plus tard, déjà pendant la période d'état et surtout pendant la défervescence, la proportion des lymphocytes augmente considérablement.

Eosinophilie. — Dans le plus grand nombre des faits de cet ordre, il s'agit moins d'une véritable leucocytose que d'une augmentation du pourcentage des cellules éosinophiles. Leur nombre absolu est cependant augmenté dans un certain nombre de cas.

Chez l'homme, à l'état normal, on trouve environ 2 p. 100 leucocytes éosinophiles dans le sang ; mais on peut observer parfois des chiffres de 4 à 5 p. 100. Des augmentations d'éosinophiles ont été signalées à l'état normal dans la race jaune ; le fait a été attribué à la présence de parasites intestinaux, si fréquents dans les pays tropicaux. Des chiffres supérieurs à 5 p. 100 doivent toujours attirer l'attention ; dans les réactions franches, la proportion atteint 10, 15, 20 p. 100 et plus.

L'éosinophilie a été constatée dans un très grand nombre d'affections diverses (1), mais surtout dans l'asthme, dans certaines intoxications, dans différentes dermatites et dans les helminthiases. L'éosinophilie est fréquente dans les crises d'asthme où elle coïncide avec l'apparition des mêmes leucocytes dans les crachats. On l'a observée dans beaucoup d'intoxications, surtout dans celles qui s'accompagnent de manifestations cutanées (dermatites toxiques et médicamenteuses, iodure de potassium, antipyrine, mercure, etc.).

Elle a été vue au cours d'un grand nombre de maladies cutanées, mais surtout dans les dermatites bulleuses (dermatite de Duhring, pemphigus, etc.) (2). Elle n'existe pas dans les brûlures où l'on ne trouve pas non plus de cellules éosinophiles dans les phlyctènes ; elle est très rare dans l'herpès et inconstante dans le zona. On l'a vue à la période terminale des fièvres éruptives, particulièrement de la scarlatine (3). Elle est très fréquente dans la lèpre (4). On l'a observée, inconstante, dans la pellagre, le bouton d'Orient, etc.

(1) Müller et Rieder, *Deutsches Archiv f. klin. Medicin*, XLVIII, 1891.
(2) Leredde et Perrin, *Ann. de dermatologie et syph.*, 1895.
(3) Zappert, *Zeitschrift f. Klin. Medicin*, XXIII, 1893.
(4) Gaucher et Bensaude, *Ann. de derm.*, VII, 1896 ; — Darier, *Ann. de derm.*, VII, 1896 ; — Jolly, *S. de Biologie*, 21 mai 1898.

C'est surtout dans les helminthiases que l'éosinophilie a été constatée. Elle est assez fréquente chez les individus porteurs de tænias, de trichocéphales, d'ascaris, etc. ; elle paraît à peu près constante dans l'ankylostomiase, où elle est surtout intense (1). La relation directe de l'éosinophilie avec l'ankylostomiase a du reste été prouvée par des expériences d'infestation chez l'homme (2).

L'éosinophilie a été constatée chez les animaux porteurs d'helminthes, en particulier chez les chevaux (3). Chez l'homme, on l'a observée, non seulement dans les helminthiases intestinales, mais dans les helminthiases viscérales (4), dans la trichinose (5), la bilharziose, la filariose (6). Mais c'est l'échinococcose qui, à cause de sa fréquence en Europe, nous intéresse le plus à ce sujet. L'éosinophilie est fréquente chez les porteurs de kyste hydatique ; mais elle manque dans près de la moitié des cas, surtout quand le kyste est mort ou en voie de suppuration (7). Ce qui semble surtout déterminer l'apparition ou l'augmentation de l'éosinophilie, c'est le passage, à travers la membrane du kyste, d'une quantité plus ou moins grande de liquide, comme le montrent les cas de rupture accidentelle ou l'afflux du liquide dans la cavité abdominale au cours des ponctions ou des interventions chirurgicales (8).

L'éosinophilie a été encore rencontrée dans la dysenterie amibienne, dans la tuberculose, la syphilis, certaines tumeurs malignes, etc. Elle est fréquente à la suite de la splénectomie et paraît être ici l'expression d'une suractivité fonctionnelle de la moelle osseuse.

Les circonstances nombreuses et variées dans lesquelles l'éosinophilie a été rencontrée ne permettent pas d'y voir une réaction appartenant en propre à une catégorie particulière d'états morbides. La présence d'une réaction bien marquée et persistante permet seulement, en l'absence d'autres causes morbides, de soupçonner la présence d'une affection vermineuse.

(1) D'après la statistique donnée par Weinberg, qui porte sur un nombre considérable de cas, il semble qu'il y ait à ce sujet une très grande différence entre l'ankylostomiase et les autres helminthiases intestinales. Voir Weinberg et Léger, l'Éosinophilie *in Traité du sang*, Gilbert et Weinberg, Paris, 1913, I. Voir aussi Levaditi, *Bull. de l'Institut Pasteur*, 1905 et Schwarz, *Ergebnisse der allgemeinen Pathologie*, XVI, 1914.

(2) Boycott, *Lancet*, 18 et 25 mars 1911.

(3) Weinberg et Alexander, *Bull. Soc. path. ex.*, 1908.

(4) Lams, *Rev. de méd.*, mai 1907.

(5) Schleip, *Deutsches Archiv f. klin. Medicin*, LXXX, 1904.

Bittner, *Folia hæmatologica*, XV, 1913.

(6) Vaquez et Clerc, *S. de Biologie*, 13 décembre 1902 ; — Sicard et Blais, *S. de Biologie*, 13 décembre 1902.

(7) Rossello, *S. de Biologie*, 9 novembre 1907.

(8) Chauffard et Boidin, *S. méd. des hôpitaux*, 13 décembre 1907 et 22 avril 1910

On a publié quelques observations dans lesquelles l'éosinophilie se manifestait, non plus seulement comme une réaction temporaire, mais dans lesquelles le nombre absolu des leucocytes était élevé et la proportion des leucocytes éosinophiles, extrêmement forte (70 à 90 p. 100) ; cet état était permanent et s'accompagnait de splénomégalie; on observait, de plus, une petite proportion de myélocytes (1). Aussi ces faits ont-ils été parfois publiés sous le nom de leucémie. Il semble s'agir là de réactions spéciales, d'origine inconnue. Certaines lymphomatoses peuvent s'accompagner d'une éosinophilie assez intense (2).

Myélocytose. — Au cours de certaines leucocytoses polynucléaires aiguës, au moment de la défervescence dans la pneumonie, dans la diphtérie, dans l'anémie aiguë post-hémorragique, dans les anémies graves, dans certains cas de purpura, etc., on a observé l'apparition de myélocytes, reconnaissables à leurs granulations cytoplasmiques et à leur grand noyau ovalaire ou réniforme. Mais cette réaction est peu intense. Dans certains cas cependant, les myélocytes apparaissent en nombre assez important pour caractériser une forme spéciale de leucocytose, comme l'a montré *E. Weil* (3) dans la variole.

Dans les cas de variole observés dès le début, la réaction leucocytaire apparaît comme une leucocytose polynucléaire, mais au moment de la vésiculation, l'aspect du sang change, les lymphocytes augmentent de nombre et les myélocytes apparaissent dans la proportion de 4 à 6 p. 100. Dans la variole suppurée, la myélocytose persiste pendant tout le stade de suppuration des pustules. Dans les pustules mêmes on trouve, au milieu de nombreux polynucléaires, un certain nombre de myélocytes. Dans les formes hémorragiques, le nombre de myélocytes peut atteindre 10 à 20 p. 100; le sang contient alors aussi des globules rouges nucléés, parfois nombreux. Les complications infectieuses de la convalescence (angines, abcès, broncho-pneumonie) produisent en général une augmentation des polynucléaires.

La varicelle et la vaccine produisent des modifications du sang comparables à celles de la variole, mais elles sont moins constantes et beaucoup moins accentuées. L'apparition des myélocytes a été

(1) Aubertin et Giroux, *Presse médicale*, 20 avril 1921; — Giffin, *Am. J. of the med. Sciences*, novembre 1919.

(2) Voir ch xvii: Maladie de Hodgkin.

(3) E. Weil, *S. de Biologie*, 23 juin 1900 et Th. Paris, 1901; — Weil et Clerc, *la Leucocytose en clinique*, Paris, 190

aussi vue dans d'autres maladies, en particulier au cours de l'évolution des tumeurs malignes (1) et des purpuras (2).

Leucocytose à matzelles. — L'augmentation des leucocytes à granulations basophiles a été signalée exceptionnellement au cours d'un certain nombre de maladies. Mais ce sont là des réactions rares, fugitives et toujours très faibles dans les cas signalés. Cependant, *Levaditi* (3), en injectant au lapin des toxines staphylococciques et diphtériques, a pu obtenir chez cet animal une augmentation assez considérable des mastzelles, atteignant 9 à 13 p. 100. *Pröscher* (4) avait obtenu une réaction analogue chez le lapin, par l'injection de substances hémolytiques. Le lapin a déjà, à l'état normal, 4 à 5 p. 100 de mastzelles dans le sang; il est donc prédisposé à cette réaction qui s'accompagne de polynucléose et qui paraît être un phénomène accessoire de la leucocytose polynucléaire chez le lapin.

Valeur diagnostique de la leucocytose. — Les recherches cliniques peuvent bénéficier de la connaissance de la leucocytose. Mais cette réaction n'a rien de spécifique; la leucocytose n'est qu'un symptôme capable de contribuer utilement à poser le diagnostic.

C'est surtout dans le diagnostic des suppurations profondes que la connaissance d'une leucocytose peut être utile au clinicien. D'une manière générale, la leucocytose polynucléaire est constante dans toutes les suppurations aiguës. La constatation de cette réaction sanguine aidera donc à poser le diagnostic des suppurations pelviennes, des abcès périnéphrétiques, des suppurations pleurales, surtout interlobaires et médiastines (5). La leucocytose polynucléaire facilitera aussi le diagnostic des abcès hépatiques (6).

Lorsque l'abcès se fait jour au dehors ou s'ouvre dans une cavité

(1) Dans un cas de Dieballa et Entz (*Folia hæmatologica*, XV, 1913), il y avait 107.000 leucocytes dans le sang avec 82 p. 100 de polynucléaires et 8 à 9 p. 100 de myélocytes. De pareils faits ont beaucoup d'intérêt pour l'étude de la pathogénie des leucémies. Voir ch. XVII.

(2) Lenoble, *la Clinique infantile*, 1904; — Nobécourt, Tixier et Maillet, *Archives de méd. des enfants*, 1913.

(3) Levaditi, *J. de phys. et de path. gén.*, 1901. — Levaditi, Th. Paris, 1902; *le Leucocyte et ses granulations*. Collection Scientia. Paris, 1902.

(4) Pröscher, *Folia hæmatologica*, VII, 1909.

(5) Malassez, *Soc. anatomique*, 1873; — Bonne, Th. Paris, 1875; — Rieder, *l. c.*

(6) Marcano, *Archives de méd. exp.*, XXI, janvier 1909. Pour le diagnostic des gros foies, il faut se rappeler que la leucocytose polynucléaire peut exister dans le cancer secondaire du foie et dans la cirrhose hypertrophique avec ictère chronique, moins intense, il est vrai, que dans les abcès.

naturelle (tube digestif, vagin), la leucocytose tombe le plus souvent avec la fièvre ; elle s'atténue et disparaît lorsque l'abcès, sans s'ouvrir, s'enkyste. Dans l'appendicite aiguë, la leucocytose existe en général dès le début ; si la crise est légère, si la résolution survient, le nombre des leucocytes retombe rapidement à la normale. Elle persiste au contraire dans les cas où il se forme un abcès et le chiffre des leucocytes s'élève (1). Au début, la leucocytose, utile au diagnostic, pour différencier l'appendicite des affections douloureuses de l'abdomen qui peuvent la simuler (2), ne peut cependant fournir aucune indication précise. Sa persistance, au contraire, même lorsqu'elle coïncide avec une chute de la température, est une indication précieuse en faveur de l'abcès. La leucocytose manque le plus souvent dans les cas très graves dès le début, dans les formes très toxiques avec péritonite généralisée ; elle manque aussi, le plus souvent, dans les abcès anciens et enkystés. C'est là, du reste, une règle à peu près générale pour toutes les suppurations.

La diversité des maladies dans lesquelles l'éosinophilie a été constatée enlève à cette réaction beaucoup de valeur ; cependant, sa présence, dans les affections dues à des helminthes, permettra, en dehors d'autres causes morbides, de soupçonner l'existence de parasites et d'aider surtout au diagnostic de l'ankylostomiase et du kyste hydatique.

La myélocytose pourra servir au diagnostic de la variole, surtout dans les cas de variole hémorragique où la réaction est plus marquée (3).

Valeur pronostique de la leucocytose. — La leucocytose peut, dans certains cas, donner des renseignements pour établir le pronostic. Dans la pneumonie, la continuation de la leucocytose polynucléaire au delà de la période normale est ordinairement en rapport avec une défervescence incomplète et irrégulière. A cette période, l'élévation de la leucocytose indique le passage de la pneumonie à la suppuration et par conséquent, est d'un pronostic grave. Inversement, la réapparition des lymphocytes et des éosinophiles en

(1) Curschmann, *Münch. med. Woch.*, 26 novembre et 3 décembre 1901.

(2) M. Cazin, *XVe Congrès français de chirurgie*, 1902 ; — M. Cazin et E. Gros, *Semaine médicale*, 6 mai 1903 ; — Wassermann, *Münchener med. Woch.*, 29 avril et 6 mai 1902 ; — Tuffier, *Ass. fr. de chirurgie*, XVIIe Congrès, octobre 1904 ; — Barth, *Soc. med. des Hôp.*, 23 octobre 1903.

(3) La présence des myélocytes dans le sang, chez les malades atteints de variole hémorragique, ne permet pas d'attribuer à ce symptôme une valeur diagnostique spécifique des purpuras, comme l'ont voulu quelques auteurs.

assez grand nombre, précédant le retour à l'équilibre normal, indique la fin de la réaction et l'approche de la guérison (1).

Dans ces cas, la leucocytose nous apparaît donc comme une réaction qui nous donne la mesure de l'intensité de la maladie. Mais il n'en est pas toujours ainsi. Dans beaucoup d'infections expérimentales, lorsqu'on opère avec des cultures très virulentes et avec des doses considérables, capables de tuer rapidement, la leucocytose ne se produit pas, et même le chiffre des leucocytes tend plutôt à s'abaisser d'une façon durable. C'est ce qu'on peut voir chez l'homme, au cours de la pneumonie par exemple, où l'on a constaté l'absence de leucocytose dans des cas graves rapidement mortels. La contradiction qui semble exister entre les deux ordres de faits n'est qu'apparente. Dans les cas où la leucocytose continue au delà de la période normale de défervescence, dans la pneumonie, le symptôme indique l'évolution de la lésion vers la suppuration et le pronostic est de ce fait aggravé (2); dans les cas mortels où la leucocytose était absente, il s'agissait d'infections graves dès le début, empêchant l'organisme de réagir. L'absence de leucocytose au cours d'une maladie infectieuse où cette réaction est habituelle ne suffit cependant pas à faire porter un pronostic fatal. La leucocytose ne paraît pas indispensable pour la guérison, pas plus qu'elle ne semble nécessaire, au point de vue expérimental, pour immuniser un animal (3).

Leucocytose expérimentale. Interprétation de la leucocytose. — On a cherché à éclairer le mécanisme et la signification de la leucocytose par l'expérimentation. On a obtenu cette réaction chez les animaux par des hémorragies abondantes et par l'injection sous-cutanée ou intra-veineuse d'un grand nombre de substances actives (cultures microbiennes, toxines microbiennes et végétales, etc.). On l'obtient facilement, chez le lapin, par l'injection dans la veine marginale de l'oreille d'une culture virulente de staphylocoque. La réaction qu'on

(1) Lams, *Revue de médecine*, 1907. — Dans la leucocytose précoce des blessés de guerre, qui est naturellement une polynucléose, Brodin et Saint-Girons (*S. de Biologie*, 13 avril 1918) ont attribué une valeur pronostique mauvaise à la prédominance des grands mononucléaires.

(2) Dans les cas où la leucocytose polynucléaire s'élève, le pourcentage des polynucléaires a une tendance à augmenter, comme le nombre absolu, et les formes cellulaires à noyau plus découpé sont aussi souvent plus nombreuses. Mais contrairement aux idées exprimées par quelques auteurs (Arneth, *Deutsche med. Woch.*, 1904; Sabrazès, in *Traité du sang*, de Gilbert et Weinberg, Paris, 1913, I, p. 326) il est difficile de tirer de l'évaluation du nombre des lobes nucléaires des renseignements utiles au pronostic.

(3) Voir les observations de J. Nicolas, P. Courmont et R. Prat pour l'immunisation avec la toxine diphtérique (*S. de Biologie*, 29 mai 1897 et 10 novembre 1900, *Archives de méd. exp.*, 1897, et *J. de phys. et de path. gén.*, novembre 1900).

provoque dans ces cas est une leucocytose polynucléaire, et c'est son interprétation qui doit d'abord nous arrêter.

On s'est demandé parfois si la leucocytose ne résulterait pas tout simplement d'une inégale répartition des globules blancs dans l'arbre vasculaire (1) ; mais l'augmentation de nombre est bien réelle, car elle existe dans le sang profond, comme dans le sang périphérique. Pourtant on trouve souvent des différences très grandes. Le fait est particulièrement fréquent chez le lapin. Chez un animal atteint d'une forte leucocytose polynucléaire de suppuration, on peut, entre le sang de la carotide, de la fémorale, de la veine jugulaire d'une part, et le sang des veines auriculaires d'autre part, trouver des différences allant du simple au double (2). D'une manière générale, l'augmentation du nombre des leucocytes existe bien dans le sang profond ; mais elle est beaucoup plus grande dans le sang périphérique.

Fig. 249. — Sang humain mélangé *in vitro* à une solution NaCl à 9 p. 1.000 peptonée à 10 p. 100. Mouvements d'un leucocyte observés 24 heures après, à 34°.

Par contre, la distribution inégale des leucocytes peut servir à expliquer les abaissements brusques et passagers du nombre des leucocytes qu'on provoque par les inoculations intra-veineuses et qui précèdent la phase de leucocytose. Cette hypoleucocytose passagère peut être produite aussi par les injections de peptone. On l'a attribuée quelquefois à la leucolyse (3) ; mais les solutions de peptone, en eau salée isotonique, à des degrés de concentration variés, n'empêchent nullement *in vitro*, les mouvements amiboïdes des leucocytes, au moins pendant quelques heures, et, par conséquent, ne les détruisent pas (4). Du reste, chez les animaux sacrifiés pendant la phase d'hypoleucocytose, on trouve les leucocytes accumulés dans les capillaires viscéraux. Cette accumulation a été longtemps considérée comme un effet de répulsion, de chimiotaxie négative (5). Mais on peut en donner une explication plus simple : la rétention des leucocytes dans les territoires capillaires où la circulation est ralentie.

(1) Schulz G., *Deutsches Archiv f. klin. Medicin*, LI, 1893.
(2) Jolly, *S. de Biologie*, 20 juillet 1918.
(3) Delezenne, *Archives de physiologie*, 1898.
(4) Jolly, *XIIIe Congrès int. de médecine*, Paris, 1900, et *S. de Biologie*, 20 juillet 1918. Dastre, V. Henri et Stodel, *S. de Biologie*, 14 novembre 1903.
(5) Goldscheider et Jacob, *Zeitschrift f. klin. Medicin.*, XXV, 1894, et *Arch. f. Phys.*, 1894 ; — Tschistowitsch, *Saint-Petersburger med. Wochenschrift*, XX, 1895 ; — Werigo, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1892 ; — Jacob P., *Zeitschrift f. klin medicin.*, XXX, 1896.

L'hypoleucocytose passagère qui suit les inoculations intraveineuses est donc le résultat de troubles vaso-moteurs momentanés (1) et de changements d'état physique du plasma favorisant la rétention leucocytaire.

L'augmentation du nombre des leucocytes, pendant la leucocytose polynucléaire, ne provient pas d'une multiplication des leucocytes dans le sang; des figures de caryocinèse n'ont été rencontrées que dans le sang leucémique (voir ch. XVII). On ne les trouve pas dans le sang, pendant la leucocytose. Au contraire, un certain nombre de faits nous permettent de penser que la leucocytose est due à l'afflux de nouveaux leucocytes venus des organes hémopoiétiques, constituant des réserves. A l'état normal, ce sont les organes hémopoiétiques qui font les frais de la réparation du sang; il est assez naturel de penser qu'ils jouent le même rôle dans la leucocytose. Or, on a observé leur suractivité au cours de maladies qui donnent lieu à la leucocytose (2); on a constaté, après la splénectomie, des éosinophilies et des lymphocytoses qui apparaissent comme l'effet de phénomènes de suppléance de la moelle et des ganglions (3); on a vu enfin, au cours de la leucocytose, affluer au sang des globules rouges nucléés (4), et des myélocytes. Ces différents faits tendent à nous montrer le rôle des tissus formateurs et particulièrement de la moelle osseuse dans la leucocytose, qui, dans les suppurations aiguës par exemple, nous apparaît comme un phénomène intermédiaire, le sang étant le véhicule qui transporte les leucocytes des réserves jusqu'aux points d'accumulation (5).

La raison de l'afflux des leucocytes dans le sang a été placée dans l'attraction chimio-tactique. Suivant la présence dans le sang ou les tissus, de tel ou tel produit toxique, telle variété de leucocytes serait

(1) Voir plus haut ce que nous avons dit de la distribution inégale des leucocytes et de l'influence de la stase. La rétention leucocytaire ne peut suffire à expliquer les chutes persistantes de leucocytes qu'on observe dans certains états pathologiques (voir plus loin). L'abaissement brusque des leucocytes produit par les injections de cultures microbiennes, dans les veines, s'accompagne aussi d'une disparition transitoire des globulins qui est due à la même cause. Voir AYNAUD, *S. de Biologie*, 14 janvier 1911. L'abaissement brusque du nombre des leucocytes peut être produit par l'introduction de substances irritantes dans l'estomac (HOLTZMANN, *Archives des sc. biologiques* de Saint-Pétersbourg, II, 1893).

(2) ROGER et JOSUÉ, *S. de Biologie*, 12 décembre 1896, 27 mars et 17 juillet 1897. Voir aussi ch. XII. DOMINICI, *XIIIe Congrès int. de médecine*, Paris, 1900. Section d'an. path.

(3) HARTMANN et VAQUEZ, *S. de Biologie*, 30 janvier et 5 juin 1897.

(4) DOMINICI, *Soc. anatomique*, 23 et 30 octobre 1896. *Soc. de Biologie*, 24 juillet 1897; — SHERRINGTON, *Proc. of the Royal Society of London*, LV, 1894; — TIMOFEJEWSKI, *Centralblatt f. allgem. Pathologie*, VI, 1895.

(5) Les métaplasies myéloïdes disséminées peuvent s'ajouter à l'hyperplasie de la moelle osseuse pour expliquer certaines réactions leucocytaires (éosinophilie, myélocytose); cf. WIDAL et FAURE-BEAULIEU, *J. de Physiologie*, IX, 1907.

attirée; on comprend qu'il puisse y avoir ainsi des réactions leucocytaires différentes. Cette théorie de la chimiotaxie élective, due surtout à *Ehrlich* (1), est à l'heure actuelle, celle qui rend le mieux compte des faits ; mais elle n'est pas encore absolument démontrée. On a cherché cependant à produire expérimentalement, avec des toxines différentes, l'apparition de types cellulaires différents. On a réussi à reproduire l'éosinophilie par l'injection de liquide hydatique et d'extraits d'helminthes (2); on a provoqué l'apparition de mastzelles chez le lapin avec la toxine diphtérique (3), et de myélocytes avec l'inoculation de produits varioliques (4). A l'appui de cette théorie, il faut citer encore l'afflux des polynucléaires qui, sous l'influence d'une infection intercurrente, viennent modifier l'état du sang dans la leucémie (5), et dans l'éosinophilie (6). Toutefois, dans cet ordre d'idées, les faits positifs sont assez rares; leur grande inconstance diminue leur valeur. Aujourd'hui encore, nous n'avons aucun moyen de produire à volonté, par un poison déterminé, une éosinophilie, une lymphocytose, une myélocytose; les principaux facteurs du phénomène nous échappent encore.

La plupart des causes inflammatoires provoquent avant tout l'afflux des polynucléaires. Si ces éléments sont ceux qui arrivent le plus facilement dans le sang et dans les exsudats, c'est qu'ils sont les plus actifs, ceux qui diapédèsent avec la plus grande facilité. Ce sont aussi ceux qui sont fabriqués en plus grand nombre dans la moelle et qui représentent le terme ultime de l'évolution normale des leucocytes (voir ch. XII).

On a cherché à établir une relation entre l'éosinophilie et la destruction de globules rouges. Cependant l'éosinophilie est absente dans beaucoup de cas où la destruction globulaire est certaine et inversement. La relation de l'éosinophilie avec les hémorragies et les destructions globulaires est peut être indirecte, l'hémolyse mettant en liberté des substances capables d'attirer les éosinophiles des foyers hémopoiétiques et particulièrement de la moelle osseuse.

Certains auteurs, s'appuyant sur la présence de nombreuses cel-

(1) EHRLICH, *XIIIe Congrès int. médecine.* Paris, 1900. Section d'anatomie path. Voir aussi EHRLICH et LAZARUS, Die Anæmie.

(2) ACHARD et LŒPER, *Soc. méd. des hôpitaux*, 13 juillet 1900.
WEINBERG et LÉGER, *S. de Biologie*, 11 avril 1908, et *Bull. Soc. path. exotique*, 1908.

(3) LEVADITI, Th. Paris, 1902.

(4) ROGER et E. WEIL, *S. de Biologie*, 15 novembre 1902.

(5) E. WEIL, *XIIIe Congrès int. de médecine*, Paris, 1900, et *Gaz. hebd.*, septembre 1900.

(6) EHRLICH, *XIIIe Congrès int. de médecine*, Paris, 1900. Section d'anatomie pathol.

lules éosinophiles dans la paroi des kystes hydatiques et au voisinage des lésions parasitaires viscérales accompagnées d'éosinophilie sanguine, ont voulu placer dans ces tissus l'origine de la réaction. Il est certain qu'autour de ces lésions viscérales, les leucocytes éosinophiles sont souvent très nombreux (1). Mais la plupart de ces cellules ont les mêmes caractères que celles qui existent dans le sang et les exsudats et l'on peut admettre qu'elles sont arrivées par diapédèse. Des leucocytes éosinophiles peuvent se former directement dans le tissu conjonctif, aux dépens de cellules lymphoïdes (voir ch. XI). Mais il est bien probable que le plus grand nombre de celles qu'on observe dans le tissu conjonctif enflammé sont des cellules diapédésées (2).

Comme les lymphocytes ont des mouvements amiboïdes beaucoup moins vifs que ceux des leucocytes polynucléaires et des leucocytes éosinophiles, on a supposé qu'ils n'étaient pas capables de diapédéser. Dans la lymphocytose, ils arriveraient dans le sang, non par leur activité propre, mais d'une manière passive, déversés par le canal thoracique, la lymphocytose étant due à des modifications dans la circulation de la lymphe et non à une diapédèse élective (3). Mais depuis que cette théorie a été soutenue, la démonstration de la mobilité des lymphocytes et de leur capacité de diapédéser a été faite d'une manière absolument certaine (4).

La leucocytose nous apparaît avant tout comme un phénomène intermédiaire, la preuve visible, la phase sanguine du passage des leucocytes des tissus hémopoiétiques jusqu'aux lieux où ils diapédèsent et s'accumulent. On a voulu voir dans cette réaction quelque chose de plus; on l'a considérée comme un acte de défense et on l'a rattachée au problème de l'immunité. On a pensé que si les leucocytes arrivaient au sang, c'était pour aller exercer leur action phagocytaire soit dans le sang, soit au niveau des points envahis par les agents pathogènes. Mais dans les cas où ces foyers inflammatoires n'existent pas, cette interprétation n'est plus possible ; ainsi en est-il dans les intoxications.

(1) Devé, *S. de biologie*, 1er juillet 1905. — Sabrazès et Léger, *Réunion biologique de Bordeaux*, 6 décembre 1910.

(2) L'éosinophilie locale ne s'accompagne pas nécessairement d'éosinophilie sanguine ; mais l'éosinophilie sanguine peut être sous la dépendance d'une suractivité fonctionnelle de la moelle et d'une hyperplasie tissulaire (métaplasie myéloïde). Cf. Widal et Faure-Beaulieu, *J. de Phys.*, IX, 1907.

(3) Ehrlich et Lazarus, *l. c.*

(4) Voir ch. V. La théorie de la lymphocytose passive, telle que l'avait soutenue Ehrlich, ne peut donc être conservée. Il est possible cependant que les modifications de la pression lymphatique jouent un certain rôle dans ce phénomène et que le canal thoracique déverse, à certains moments, un plus grand nombre de lymphocytes dans le sang.

Metchnikoff a admis que les leucocytes venaient dans le sang absorber la toxine, la détruire, ou fabriquer l'antitoxine, mais cette manière de voir n'est pas démontrée. Il n'est pas certain que dans les cas graves où la leucocytose ne se produit pas, la mort soit due à l'absence de réaction; la leucocytose ne semble indispensable ni à la guérison ni à l'immunisation.

L'étude de la leucocytose nous amène ainsi à examiner la question des rapports des leucocytes avec l'immunité.

Leucopénie. Choc anaphylactique. Hémoclasie. — En étudiant la leucocytose, nous avons eu l'occasion de parler des abaissements du nombre des globules blancs que l'on observe dans les expériences ou dans les faits cliniques. Ces abaissements numériques sont de plusieurs sortes :

Un premier ordre de faits correspond aux chiffres faibles, persistants qu'on peut observer dans certaines maladies infectieuses, comme la fièvre typhoïde, et qui contrastent avec la leucocytose polynucléaire habituelle des maladies aiguës infectieuses ; ces phénomènes ne paraissent avoir du reste aucune importance spéciale, pas plus que les chiffres faibles et durables que l'on peut observer dans certaines anémies. Au contraire, la chute des leucocytes au cours d'une leucocytose aiguë, peut, comme nous l'avons vu plus haut, avoir, suivant les cas, une signification favorable ou mauvaise.

Un deuxième ordre de faits est beaucoup plus intéressant. Il correspond aux abaissements brusques des leucocytes avec diminution de la proportion des polynucléaires, que l'on observe dans les minutes qui succèdent aux injections intra-veineuses de substances albuminoïdes diverses, de peptone, de cultures microbiennes, de toxines, etc. Cette crise s'accompagne d'une chute brusque de pression, de troubles de la coagulation, d'une raréfaction des globulins, de l'aspect rutilant du sang veineux et de variations brusques de l'indice réfractométrique du sérum. Ces phénomènes, que l'on a appelés parfois choc protéique, mais qui peuvent s'observer aussi à la suite de l'injection de suspension colloïdales métalliques et aussi de substances cristalloïdes à haute dose se voient également dans le choc anaphylactique. Mais ici, il suffit de doses beaucoup plus faibles pour les produire, car l'animal est déjà sensibilisé. On tend aujourd'hui à voir dans ces crises brusques et passagères le résultat de phénomènes d'ordre physique, consistant essentiellement dans un changement d'état physique, dans une modification brusque de l'équilibre de l'état colloïdal

du plasma sanguin. C'est ce que l'on peut appeler avec *Widal* le choc colloïdal, l'hémoclasie (1).

La diminution brusque et progressive du nombre des leucocytes du sang, qui est le signe le plus évident de cette crise, doit être recherchée par des numérations successives faites à de courts intervalles. Elle peut servir d'épreuve pour l'exploration de la fonction du foie (2). La leucopénie s'accompagne d'une diminution considérable dans la proportion des polynucléaires ; leur chiffre devient momentanément beaucoup plus faible que celui des lymphocytes.

La leucopénie que l'on observe dans cette crise est due avant tout à la rétention des leucocytes dans certains territoires vasculaires, rétention qui est aujourd'hui prouvée. Certains auteurs veulent encore y voir, en partie du moins, une leucolyse, qui ne semble pas démontrée (3).

Le choc anaphylactique s'accompagne, dans beaucoup de cas, d'une diminution considérable des globulins (4); c'est un phénomène du même ordre que la leucopénie et qui est dû aussi à une rétention.

Il existe cependant un dernier ordre de faits, dans lesquels la leucopénie ne peut être entièrement expliquée par la rétention leucocytaire. Ce sont les abaissements considérables et durables de globules blancs que l'on observe dans certaines intoxications. Ces faits ont été observés d'abord avec le benzène (5). Ils ont été vus ensuite dans les expériences faites avec l'ypérite en inhalations et en injections (*Muratet*). Dans ces expériences, on a observé dans le sang, en petit nombre, des figures de pycnose des leucocytes, qui ont été retrouvées aussi dans les organes hémopoiétiques. On a été ainsi conduit à penser que ces abaissements sont dus à une véri-

(1) Widal, Abrami et Brissaud, *Presse médicale*, 3 avril 1920, et *Sem. méd.*, 24 décembre 1913. Cette manière de voir a été appliquée par Widal à l'explication de beaucoup de phénomènes qui se présentent en clinique sous forme de crises, en particulier à l'attaque d'asthme, à l'urticaire alimentaire, au choc traumatique et à l'hémoglobinurie paroxystique.

(2) Widal, Abrami et Iancovesco, *Presse médicale*, 11 décembre 1920. A la leucopénie, aux troubles de la coagulation et à la diminution de l'indice réfractométrique du sérum s'ajoutent, dans certains cas, au cours du choc anaphylactique, de la polyglobulie et l'apparition d'hématies nucléées. Voir Ch. Richet, Brodin et Saint-Girons, *C. R. Ac. des sc.*, 24 février 1919.

(3) Pour Fiessinger (*Journal méd. français*, juin 1920), cette leucolyse aurait pour effet de mettre en liberté les oxydases leucocytaires. Dans le sang, au cours du choc peptonique, on a pu mettre en évidence des nucléoprotéides qui rendent le sang normal incoagulable (Doyon). On les a trouvés au cours du choc anaphylactique. Brodin et Ch. Richet, *S. de Biologie*, 12 février 1921.

(4) Achard et Aynaud, *S. de Biologie*, 23 mai 1908 et 10 juillet 1909, et Aynaud, Th. Paris, 1909.

(5) Selling, *Ziegler's Beiträge f. path. An.*, LI, 1911; — Leconte, *Archives des maladies du cœur*, février 1913; — Launoy et Levy-Bruhl, *Soc. de Chimie biologique*, juin 1920 ; — Levy-Bruhl, *Biologie médicale*, 1921. Voir aussi ch. XII et XVII.

table destruction de leucocytes ; mais cette question n'est pas encore résolue.

Ces abaissements, que l'on produit chez le chien et surtout chez le lapin avec des doses sérieuses, sont parfois énormes, le chiffre des leucocytes tombant au-dessous de 1.000. Le pourcentage des polynucléaires s'abaisse. Chez les animaux intoxiqués avec des doses mortelles, le phénomène persiste jusqu'à la mort. La diminution des leucocytes existe aussi dans les vaisseaux profonds ; il est possible qu'un grand nombre d'entre eux restent accolés aux parois des petits vaisseaux.

LES LEUCOCYTES ET LE PROBLÈME DE L'IMMUNITÉ

Les leucocytes incorporent les corps étrangers pulvérulents ; ils absorbent de la même manière les microbes. Certains protozoaires parasites sont capables de pénétrer dans les cellules sanguines, globules rouges ou globules blancs ; mais les microbes qui sont absorbés par les leucocytes y trouvent généralement leur mort parce que le protoplasma de ces cellules contient les sucs digestifs nécessaires à leur destruction. Le leucocyte n'absorbe donc pas le parasite comme un simple corps étranger. En incorporant et en digérant le microbe pathogène vivant, le leucocyte l'empêche de se multiplier et de donner la maladie ; la phagocytose devient ainsi un phénomène utile à l'organisme et intimement lié au problème de l'immunité (1).

Les Protistes, les Métazoaires inférieurs (Spongiaires, Cœlentérés) s'alimentent par phagocytose et digestion intra-cellulaire. Chez les animaux plus compliqués (Arthropodes, Vers, Vertébrés), la digestion est toujours extra-cellulaire ; la phagocytose ne s'exerce plus que sur les déchets, les corps étrangers inutiles ou nuisibles. La phagocytose des microbes vivants nous apparaît ainsi, suivant la conception de *Metchnikoff*, comme un des aspects, comme un cas particulier de la digestion intra-cellulaire, mais qui, en raison des propriétés spéciales du corps phagocyté, se trouve jouer un rôle dans la défense de l'organisme contre les maladies. La phagocytose n'appartient pas seulement aux leucocytes ; elle appartient aux cellules conjonctives et endothéliales ; dans certains cas particuliers elle appartient même aussi aux cellules épithéliales (2).

(1) Metchnikoff, *Leçons sur la pathologie comparée de l'Inflammation*, Paris, 1892 ; *l'Immunité dans les maladies infectieuses*, Paris, 1901 ; *Annales de l'Institut Pasteur*, 1889, 1890 et 1899.

(2) Voir au ch. vi ce qui concerne les cellules endothéliales et les cellules épithéliales pulmonaires. Voir les observations de Metchnikoff sur les Actinies (*Zool. Anzeiger*, 1880 et 1882), et Mesnil, *Annales Pasteur*, 1901.

Tous les leucocytes sont, en principe, capables de phagocytose, mais à des degrés très divers qui dépendent d'abord de leur mobilité et de l'abondance de leur cytoplasme ; aussi le pouvoir phagocytaire des petits lymphocytes est-il à peu près nul alors que les polynucléaires exercent cette faculté d'une manière très active (1).

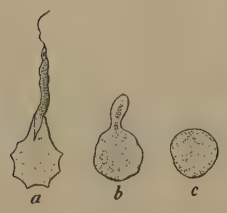


Fig. 250. — Exsudat péritonéal du rat. Trois stades successifs de la phagocytose d'un trypanosome. En *a*, la partie non englobée du trypanosome est encore mobile. D'après Laveran et Mesnil.

Les leucocytes d'un côté, les cellules endothéliales et conjonctives de l'autre, forment donc les deux grandes catégories de phagocytes. Les leucocytes absorbent surtout les microbes et les fines granulations pulvérulentes, tandis que les cellules endothéliales et conjonctives phagocytent surtout les hématies, les globules blancs et les débris cellulaires.

Il n'est pas certain qu'il s'agisse là de propriétés spécifiquement différentes. Les cellules endothéliales qui, par l'irritation, ont acquis un pouvoir phagocytaire, peuvent, par suite de leur masse protoplasmique plus grande, incorporer les corps plus volumineux. Il semble cependant que les leucocytes polynucléaires, qui circulent partout et qui sont entraînés à cette fonction, soient particulièrement adaptés à la digestion des microbes. Mais la division du travail n'a rien d'absolu : les leucocytes peuvent phagocyter les hématies dans certaines conditions ; certains microbes peuvent être phagocytés par des cellules conjonctives (bacille de la tuberculose, bacille lépreux, spirilles, protozoaires parasites, trypanosomes, etc.).

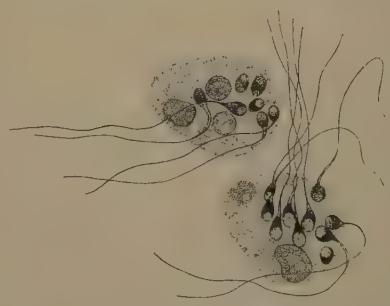


Fig. 251. — Liquide d'hydrocèle. Cellules endothéliales phagocytant des spermatozoïdes. D'après Widal.

L'englobement des microbes vivants a été démontré par des expériences faites avec des parasites mobiles (2) (spirilles, bacille pyocya-

(1) Les leucocytes éosinophiles des Mammifères possèdent aussi cette propriété, bien qu'à un moindre degré (Cf. Nattan-Larrier et Parvu, *Archives des maladies du cœur*, 1909 ; — Weinberg et Séguin, *Ann Pasteur*, 1915). Quant aux grands mononucléaires du sang, ils rentrent dans la catégorie des macrophages de Metchnikoff.

(2) Metchnikoff, *Immunité*, pp. 151 et 190 ; — Laveran et Mesnil, *Annales de l'Institut Pasteur*, XV, 1901.

nique, trypanosomes. L'expérience peut être faite aussi avec des cellules mobiles. Des spermatozoïdes recueillis dans l'épididyme ou le canal déférent d'un cobaye, sont injectés dans la cavité péritonéale d'un autre cobaye. Celui-ci a été préparé la veille par l'injection dans l'abdomen de quelques gouttes d'une solution de nitrate d'argent à 1 p. 300 ou de 1 à 2 cc. d'eau salée isotonique pour provoquer la formation d'un exsudat inflammatoire. L'expérience peut être faite aussi *in vitro* en mélangeant les spermatozoïdes à l'exsudat péritonéal. Les spermatozoïdes sont surtout englobés par les cellules endothéliales gonflées et mobilisées (1).

Les leucocytes englobent des microbes vivants et mobiles ; ils incorporent aussi des microbes virulents, comme le montrent par exemple les expériences faites avec la bactéridie charbonneuse et avec le microbe de la septicémie des souris (2).

Dans l'intérieur des cellules, les microbes sont détruits et digérés. On peut le démontrer à l'aide du rouge neutre. Dans une solution à 1 p. 100 de cette substance, les microbes vivants ne se colorent pas, tandis que les microbes englobés se colorent en rouge brun. Ces microbes colorés et probablement morts se trouvent inclus, soit dans le protoplasma même, soit dans des vacuoles digestives dont le contenu est coloré en rouge, indice de sa réaction acide (3).

On observera mieux encore les phases de la destruction intra-cellu-

(1) Les deux catégories de phagocytes (leucocytes et éléments conjonctifs) avaient reçu de Metchnikoff les noms de microphages et de macrophages. Comme il se préoccupait peu de déterminer exactement la nature des éléments histologiques qu'il observait, ces dénominations ont entraîné souvent des confusions. Sous le nom de macrophages se sont trouvés rangés des éléments différents : gros leucocytes mononucléaires du sang et de la lymphe, cellules endothéliales, cellules conjonctives, musculaires, nerveuses et épithéliales. A cette catégorie appartenaient surtout les grosses cellules à noyau arrondi de la sérosité péritonéale enflammée. Metchnikoff croyait qu'elles venaient du sang par diapédèse, par suite d'une chimiotaxie spéciale, alors qu'il s'agit pour la plupart d'éléments endothéliaux nés et transformés sur place. Rentraient aussi dans les macrophages les cellules à poussière des alvéoles pulmonaires et les cellules de Kupffer des capillaires du foie. Contrairement à ce que croyait Metchnikoff, ce sont des cellules nées sur place et non des éléments migrateurs (voir ch. VI).

Dans son beau livre récent sur l'immunité (Paris, 1920), J. Bordet considère encore les macrophages de la sérosité péritonéale enflammée comme des éléments néoformés, au cours de l'inflammation, dans les organes lymphoïdes.

D'après Metchnikoff, chacune des deux grandes catégories de phagocytes possède un ferment digestif particulier. Il distinguait une « macrocytase » digérant les éléments cellulaires et une « microcytase » digérant les microbes. Mais la diversité des éléments rangés sous la dénomination de macrophages et les expériences mêmes sur lesquelles se fondait cette distinction ne permettent guère de conserver cette conception schématique. Voir Metchnikoff, *Immunité*, p. 91, et Gengou, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1901.

(2) Mesnil, *Annales de l'Institut Pasteur*, IX, 1895, et Metchnikoff, *Immunité*, p. 152.

(3) Metchnikoff, *Immunité*, p. 192 ; — Plato, *Archiv f. mikr. Anatomie*, LVI, 1900 ; — Himmel, *Annales de l'Institut Pasteur*, XVI, 1902 ; — Le Dantec, *Recherches sur la digestion intracellulaire*, Lille, 1891.

laire des microbes, en prélevant un peu de l'exsudat, contenant les phagocytes, en le fixant sur lame et en le colorant. Tandis que beaucoup de microbes englobés se colorent encore parfaitement par les couleurs d'aniline basiques, d'autres ne prennent plus que les couleurs acides. Il faut rapprocher ces faits de ceux que l'on constate pour le noyau de beaucoup de cellules dégénérées dans les phases ultimes de sa destruction. Certains bacilles perdent leur forme allongée ; d'autres se fragmentent en grains dans l'intérieur du leucocyte.

Des microbes vivants et virulents peuvent donc être incorporés et digérés par les leucocytes (1). Si ces microbes sont pathogènes, et si la phagocytose s'exerce rapidement et avec intensité au point d'inoculation, la maladie infectieuse ne se produira pas. La phacocytose aura protégé l'organisme contre la maladie. L'inflammation apparaît ainsi comme une lutte entre le parasite et le phagocyte ; le succès de ce dernier assure la protection de l'organisme (2). Là où la phagocytose se produit, l'animal reste indemne; là où elle fait défaut, l'animal est infecté.

On peut diminuer l'intensité de la phagocytose en refroidissant l'organisme inoculé, en l'intoxiquant (3). Ces expériences montrent la relation qui existe entre la phagocytose et la protection de l'organisme. Mais la phagocytose intervient-elle seule dans l'immunité? C'est ce qu'il faut examiner.

Dans les conditions normales de leur existence, les animaux supérieurs peuvent être envahis par des microbes qui pénètrent à travers leurs téguments ou leurs muqueuses. Un grand nombre de ces parasites sont du reste indifférents ; un petit nombre seulement sont pathogènes. Les téguments sont en général assez résistants pour opposer une barrière naturelle à cet envahissement. L'exfoliation épidermique nous débarrasse de la plupart des microbes qui tentent de s'implanter entre les cellules cornées (4). Au niveau des muqueuses, oculaire et nasale, bronchique, uréthrale, vaginale, digestive, etc., les microbes sont entraînés par les liquides de sécrétion. L'action mi-

(1) On sait que certains microbes, comme le bacille tuberculeux, ont une résistance considérable aux ferments leucocytaires et peuvent rester vivants pendant des mois dans l'intérieur des cellules qui les ont phagocytés.

(2) Metchnikoff, *Virchow's Archiv*, 1884, XCVI, p. 177 et XCVII, p. 502 ; *Pathologie comparée de l'Inflammation et Immunité*, p. 139.

(3) Wagner, *Annales de l'Institut Pasteur*, IV, 1890 ; — Cantacuzène, *Annales de l'Institut Pasteur*, XII, 1898 ; — Metchnikoff, *Immunité*, p. 237.

(4) Sabouraud, *Annales de dermatologie*, X, 1899. Les culs-de-sac glandulaires, les follicules pileux sont des points faibles qui permettent la pénétration plus facile des microbes pyogènes ; la phagocytose s'observe en ces points plus nettement qu'ailleurs.

crobicide de ces liquides est en général assez faible ; elle n'appartient guère qu'au suc gastrique et dépend de sa teneur en acide chlorhydrique. Pourtant l'estomac, capable d'empêcher la pullulation de certains microbes, laisse souvent passer des microbes pathogènes (bacille d'Eberth, vibrion cholérique). A la surface de la muqueuse intestinale, les sucs digestifs sont plus nuisibles aux leucocytes qu'aux microbes et le rôle protecteur des organes lymphoïdes est assez problématique, d'autant plus que ces organes ne fabriquent guère que des lymphocytes. Dans l'intestin, les microbes pathogènes rencontrent surtout la concurrence des microbes inoffensifs (1) ; mais si, par une érosion minime ou un interstice, ils arrivent jusqu'à la couche sous-épithéliale, ils trouvent là des leucocytes et la phagocytose peut s'exercer.

Phagocytose et immunité naturelle. — Parmi les microbes nombreux qu'on rencontre à l'état normal à la surface des muqueuses, il en est souvent qui appartiennent à des espèces pathogènes, virulentes ; et pourtant, dans bien des cas, le sujet porteur ne prend pas la maladie. Cette résistance ou *immunité naturelle* a été attribuée surtout à la nature du terrain. Pour *Metchnikoff*, elle est due surtout à la phagocytose. Les spores de la bactéridie charbonneuse germent et se développent dans la lymphe du sac lymphatique de la grenouille ; ce n'est donc pas la composition chimique de cette humeur qui rend la grenouille réfractaire, mais la phagocytose qui s'exerce ici avec activité. On a opposé à cette manière de voir les propriétés bactéricides des humeurs. Mais il n'existe pas de relation constante entre l'immunité naturelle et les propriétés bactéricides. L'animal réfractaire à la maladie causée par un microbe déterminé n'est pas nécessairement celui dont le sérum a des propriétés bactéricides pour ce microbe (2). Il en est de même pour le pouvoir antitoxique des humeurs, très rare du reste, chez les animaux normaux. On ne connaît guère de cas d'immunité naturelle sans phagocytose (3). Le pouvoir bactéricide des humeurs, étant donné le grand nombre des microbes pathogènes vis-à-vis desquels il est incapable de s'exercer, se trouve donc en somme négligeable. Même quand il s'exerce, c'est la phagocytose et la destruction intracellulaire qui assurent la destruction de tous les germes.

Phagocytose et immunité acquise. — C'est à propos de l'immunité acquise, c'est-à-dire celle qui a été conférée par une vaccination, que le débat a été le plus vif entre les partisans de la théorie phagocytaire et ceux de la théorie hu-

(1) *Immunité*, p. 453.

(2) Ainsi le lapin est très sensible au charbon, et pourtant, son sérum a un pouvoir bactéricide très marqué vis-à-vis de la bactéridie charbonneuse ; le chien au contraire est peu sensible et son sérum n'est presque pas bactéricide (Tarassevitch, *Phagocytose et leucocytes*, in Gilbert et Weinberg, *Traité du sang*, p. 291).

(3) Par contre, il existe des circonstances où la phagocytose se produit et où l'animal est infecté cependant. Mais on peut répondre, il est vrai, que la phagocytose a été lente et incomplète (*Immunité*, p. 27). Les faits de propriétés bactéricides sont du reste assez rares. On a cité souvent le cas du pouvoir bactéricide du sérum du rat contre le microbe du charbon. Voir Bordet, *Traité de l'immunité*, Paris, 1920.

morale de l'immunité. Le point de départ de ces discussions a été la découverte de la bactériolyse. On sait en quoi consiste le phénomène. Si chez un cobaye immunisé préventivement contre le vibrion cholérique, on injecte dans le péritoine quelques gouttes de culture de vibrion et qu'on examine, après quelques minutes, un peu de l'exsudat, les microbes injectés sont immobilisés, transformés en granules et en voie de destruction. Le phénomène peut être reproduit *in vitro* en mélangeant la culture, le sérum de l'animal vacciné et le sérum d'un animal neuf, comme l'a montré *Bordet* (1).

Le sérum de l'animal vacciné, rendu inactif par chauffage à 56° peut être réactivé par le mélange avec le sérum d'animal neuf ; séparément, les deux sérums sont sans action ; mais leur mélange est actif. Par ces expériences, *Bordet* fut conduit à admettre que le phénomène de la bactériolyse est dû à l'action de deux substances : l'une spécifique et thermostabile, contenue dans le sérum de l'animal vacciné, l'autre, non spécifique, détruite par la chaleur, contenue dans le sérum de l'animal normal, l'alexine.

Dans ce phénomène, la phagocytose ne semblait, au premier abord, jouer absolument aucun rôle. Pour *Metchnikoff* cependant, ici encore, les leucocytes interviennent. La bactériolyse est due pour lui à l'action des ferments leucocytaires mis en liberté par la destruction d'un certain nombre de leucocytes. On peut empêcher le phénomène de se produire en favorisant la phagocytose des vibrions par l'injection préalable dans le péritoine d'un peu d'eau salée qui provoque l'afflux de nombreux leucocytes sanguins : les microbes sont phagocytés ; l'animal résiste à l'infection, et sans bactériolyse. Mais, cette expérience célèbre montre simplement que dans les conditions spéciales où l'on a opéré, il s'est produit une phagocytose intense et rapide qui n'a pas donné aux propriétés humorales le temps de se manifester. Dans le phénomène de Pfeiffer produit *in vivo*, il est certain que de nombreux leucocytes sont détruits à la suite de l'inoculation intrapéritonéale de liquides qui ne sont pas indifférents pour ces cellules. Par contre, lors des inoculations sous-cutanées, on ne voit pas sur quelles destructions repose l'apparition de la sensibilisatrice et de l'alexine dans le sérum. Le pouvoir bactéricide des exsudats riches en leucocytes polynucléaires est toujours supérieur à celui du sérum sanguin correspondant (2). Certains partisans de la doctrine humorale eux-mêmes sont donc portés à admettre l'origine leucocytaire de la substance bactéricide, de l'alexine (3). Mais pour eux, l'alexine est donnée au plasma sous la forme d'une sécrétion, par des leucocytes vivants. Pour *Metchnikoff* au contraire, la mise en liberté de l'alexine suppose une destruction des leucocytes, une « phagolyse ». S'il s'agit d'une sécrétion, en effet, le phénomène se passe en dehors de la cellule ; si la substance active est déversée hors de la cellule par une cytolyse accidentelle, la destruction des microbes reste un phénomène intracellulaire.

A ce moment, on était encore sous l'influence des idées de *Schmidt* sur la coagulation. On admettait que dans la coagulation, les leucocytes étaient détruits, et

(1) Bordet, *Annales Pasteur*, 1895 ; — Metchnikoff, *Annales Pasteur*, 1895.

(2) Gengou, *Annales Pasteur*, 1904. Expériences faites avec des exsudats obtenus par l'injection de gluten-caséine dans la plèvre de chiens et de lapins. Les leucocytes sont isolés par centrifugation.

(3) Büchner, *Munch. med. Woch.*, 1899, et *XIIIe Congrès int. méd.*, Paris, 1900. *C. R. Section de bactériologie*, p. 4 ; — Behring, *Munch. med. Woch.*, 1912 ; — Schneider, *Archiv f. Hygiene*, LXX, 1909.

que cette destruction mettait en liberté le fibrin-ferment (1). Pour *Metchnikoff*, la présence de l'alexine dans les humeurs était due à un phénomène du même ordre. Le plasma sanguin préparé en tubes paraffinés n'avait qu'un pouvoir bactéricide insignifiant alors que le sérum du même animal exsudé du caillot, avait un pouvoir beaucoup plus énergique. La substance bactéricide ne préexiste donc pas dans le plasma circulant ; elle n'est pas due à une sécrétion ; son apparition, comme celle du fibrin-ferment, est due à une destruction plus ou moins importante des phagocytes (2).

Mais, comme nous le savons bien aujourd'hui, les leucocytes ne sont pas si fragiles ; ils ne se détruisent pas dans le caillot (3). Assurément, lorsqu'on injecte dans la cavité péritonéale en quantité relativement grande, des liquides qui, comme le bouillon, ne sont nullement indifférents, on produit des destructions de leucocytes ; mais ce sont là des conditions toutes particulières, et l'apparition des propriétés bactéricides dans le sérum peut se faire en dehors de toute destruction leucocytaire apparente (4).

On ne sait pas encore exactement si l'alexine provient des phagocytes. Les nombreuses expériences qui ont été faites à l'aide d'extraits leucocytaires obtenus avec les leucocytes des exsudats ou les leucocytes séparés du sang par centrifugation sont assez contradictoires (5). Il n'est donc pas certain que les substances qui, dans le leucocyte, transforment le microbe en granules soient identiques à l'alexine du sérum. Il ne semble pas en tout cas qu'on puisse, comme tendait à le faire *Metchnikoff*, identifier les véritables ferments des leucocytes avec les substances qui transforment les microbes en granules. Les ferments digestifs qui détruisent les cellules et les microbes à l'intérieur du leucocyte sont bien probablement des substances distinctes de l'alexine.

Les microbes qui subissent la bactériolyse en présence des sérums spécifiques sont relativement rares. Il existe beaucoup d'infections où l'immunité acquise semble reposer uniquement sur la phagocytose. Toutefois, il arrive souvent que si les microbes ne sont pas transformés en granules, ils sont immobilisés et agglutinés. Les phénomènes humoraux jouent donc, dans l'immunité acquise, un rôle important.

On peut vacciner des animaux sensibles à l'aide du sérum d'animaux immunisés. La théorie humorale a naturellement vu dans ce fait un argument en sa faveur. On a cru d'abord que cette action était une action atténuante sur le microbe. On a été conduit plus tard à supposer que le sérum des animaux vaccinés exerçait aussi une action stimulante sur la phagocytose qui effectivement est

(1) Voir ch. VIII.

(2) *Immunité*, pp. 201-234. Voir aussi BORDET, *Annales de l'Institut Pasteur*, IX, 1895, et LEVADITI, *Annales Pasteur*, 1901 et 1902.

(3) JOLLY, *S. de Biologie*, 22 juin 1918. Voir aussi ch. VIII.

(4) Si l'origine leucocytaire de l'alexine (cytase de METCHNIKOFF, substance bactéricide des sérums normaux) est souvent admise, l'origine de la substance spécifique est absolument inconnue. Certaines expériences ont porté METCHNIKOFF à admettre qu'elle provenait des organes lymphoïdes et en particulier de la rate. Il y a des expériences de BORDET (*Annales de la Soc. roy. des sc. nat. et méd. de Bruxelles*, IV, 1895), qui parlent contre l'origine leucocytaire du fixateur.

(5) Les extraits sont obtenus en additionnant le sang de citrate de soude, et en centrifugeant. On recueille la couche superficielle de leucocytes et après lavage, on laisse macérer à 37°. GENGOU a obtenu de cette façon et à l'aide des acides dilués, des extraits qui transforment les microbes en granules. Voi BORDET, *Immunité*, Paris, 1920.

plus énergique chez l'animal vacciné. Cette influence stimulante a été très étudiée. Il y en avait deux explications possibles : le sérum pouvait stimuler directement les leucocytes ; le sérum pouvait rendre les microbes plus phagocytables. La découverte des opsonines semble avoir tranché la question en faveur de la deuxième interprétation (1). Les humeurs, qui n'ont qu'un rôle bactéricide secondaire, facilitent donc la phagocytose.

Ces substances favorisantes contenues dans le sérum des vaccinés (opsonines) peuvent agir sur les microbes morts aussi bien que sur les microbes vivants. Elles peuvent faciliter aussi l'englobement des particules inertes (carmin, charbon, etc.). Les opsonines déterminent sur les particules vivantes ou inertes qu'elles impresssionnent des modifications physico-chimiques particulières qui font que celles-ci s'attachent plus facilement au protoplasma des phagocytes. Cet attachement paraît être même jusqu'à un certain point indépendant de la vitalité du phagocyte. Dans l'action des opsonines interviennent donc ainsi des phénomènes de tension superficielle, d'adsorption, et même de précipitation de deux colloïdes. Des influences du même genre interviennent probablement dans l'accolement de certains microbes aux globulins (v. ch. VIII).

L'intervention de ces substances favorisantes paraît dépendre de la virulence du microbe. Elles interviennent surtout lorsque le microbe est virulent. A leur action peut même s'ajouter l'influence adjuvante de principes issus des leucocytes. Certains microbes doués d'une très grande virulence ne se laissent englober que lorsqu'ils ont macéré quelque temps dans un exsudat riche en leucocytes (2).

Phagocytose. Toxines et Antitoxines. — Dans l'immunité acquise, apparaissent ainsi dans les humeurs des propriétés nouvelles qui les rendent capables d'agglutiner, d'immobiliser, de détruire les microbes, sans l'intervention de la phagocytose, et aussi des substances capables de favoriser la phagocytose. Mais depuis la découverte de *Roux*, nous savons aujourd'hui que les plus redoutables des microbes agissent par leurs toxines. Si la phagocytose se produit rapidement et d'une manière complète au point d'inoculation, elle arrêtera le développement du microbe, et par conséquent le producteur de la toxine. Si la toxine a le temps de se produire, l'organisme lutte en fabriquant une antitoxine capable de neutraliser *in vitro* la toxine. Ici, la phagocytose n'intervient plus, et l'immunité, dans ce cas, ressemble beaucoup à l'accoutumance aux poisons minéraux et aux alcaloïdes. *Metchnikoff* a cependant essayé de rattacher ce nouveau chapitre de l'immunité à la phagocytose en supposant que les leucocytes sont capables d'absorber la toxine. En provoquant des exsudats aseptiques chez des poules auxquelles il injectait préalablement la toxine tétanique, il avait pu se convaincre que les exsudats, beaucoup plus riches en leucocytes que le sang, étaient aussi plus tétani-

(1) Toutefois, ces substances favorisantes (opsonines) ne semblent pas indispensables à la phagocytose qui peut se faire sans elles. Certains travaux tendent à nous faire penser qu'il y a dans les sérums des substances capables d'agir sur les phagocytes même (pouvoir leuco-activant des humeurs. Voir Foix, Th. Paris, 1911 et Achard et Foix, in Gilbert et Weinberg, II). Pour la question de l'index opsonique, voir Bordet, *Immunité*, et les Traités de bactériologie. Cf. aussi Achard et Foix, *l. c.*

(2) Voir les faits découverts par Bordet avec le streptocoque, *Immunité*, p. 230. Ce nouveau facteur adjuvant est distinct des opsonines.

gènes que lui (1). Il avait aussi interprété en faveur de son hypothèse une expérience de *Wassermann et Takaki :* un cerveau de cobaye neuf est broyé avec de la toxine tétanique ; si on injecte le mélange à un cobaye, on ne produit pas le tétanos. Avec des doses suffisantes cependant, on peut faire périr le cobaye, en injectant le mélange dans la cuisse ; si la même dose est injectée dans la cavité péritonéale, le cobaye reste indemne (2). C'est, dit *Metchnikoff*, parce que les phagocytes du péritoine ont absorbé les particules de substance cérébrale émulsionnée, substance cérébrale qui a fixé la toxine (3).

Mais, comme moyen de démontrer la présence de la toxine dans les leucocytes, nous n'avons que l'observation des effets de ses propriétés biologiques. On a donc cherché à remplacer la toxine microbienne par des alcaloïdes, qui, comme l'atropine, manifestent leur présence par des propriétés physiologiques tout à fait caractéristiques. A ce sujet, les expériences de *Calmette* paraissent répondre d'une manière positive (4).

Il est parfois possible cependant de déceler directement la présence du poison dans les leucocytes. C'est ce qu'a fait *Besredka* en injectant dans la cavité péritonéale du cobaye un sel toxique, peu soluble, le trisulfure d'arsenic, dont les particules sont absorbées par les cellules endothéliales enflammées qui protègent ainsi l'animal contre l'intoxication (5). Ces expériences sont à rapprocher de celles de *Kobert* sur l'absorption du saccharate de fer soluble par les leucocytes, répétées avec succès par *Metchnikoff* (6), et de celles *d'Arnozan* et *Montel* (7) sur l'absorption du calomel et du salicylate de soude par les leucocytes. Elles sont aussi à rapprocher des expériences sur l'absorption de la gélatine (8).

Cependant, les expériences précédentes ne suffisent pas à entraîner la conviction. Dans ces expériences, la substance toxique est introduite dans l'organisme sous des formes diverses. Lorsqu'elle est introduite à l'état de particules presque insolubles comme le trisulfure d'arsenic, il n'est pas étonnant qu'elle soit phagocytée. Dans d'autres cas, elle est soluble et se trouve fixée sur des particules émulsionnées ; mais cette fixation, due à des causes physico-chimiques se produit aussi bien sur les granules colloïdaux et sur les globules rouges ; c'est un phénomène de surface qui n'est pas particulier aux leucocytes. L'absorption *élective* des toxines par les leucocytes n'est donc pas démontrée. Même si le rôle des leucocytes dans l'absorption des toxines était mis en évidence, il faudrait encore rendre compte de la présence des substances antitoxiques dans le sérum

(1) Metchnikoff, *Annales Pasteur*, 1897.

(2) Metchnikoff, *Annales Pasteur*, 1898.

(3) La toxine est capable aussi de se fixer sur des substances inertes comme le carmin ; cette fixation est du reste très instable. Voir Stoudensky, *Annales Pasteur*, 1899.

(4) Calmette injecte dans les veines d'un lapin une forte dose de sulfate d'atropine ; il saigne l'animal, recueille séparément, par centrifugation, le plasma et les leucocytes. Le plasma, injecté à d'autres lapins, produit peu de phénomènes tandis que l'injection des leucocytes produit des troubles graves caractéristiques et la mort. *S. de Biologie*, volume cinquantenaire, 1899. Voir Lombard, Th. Paris, 1901 ; — Weinberg et Seguin, *Ann. Pasteur*, 1915.

(5) Besredka, *Annales de l'Institut Pasteur*, XIII, 1899.

(6) On peut déceler, dans ce cas, la présence du fer, par la réaction du bleu de Prusse dans les leucocytes, les cellules étoilées du foie, les cellules de la rate et de la moelle des os. Metchnikoff, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1898.

(7) Arnozan et Montel, *XIIIe Congrès int. de médecine*, Paris, 1900.

(8) Solution à 10 p. 100 injectée dans le péritoine du chien ; apparition de gouttelettes colorables par le rouge neutre dans les leucocytes. (Metchnikoff, *Immunité*.)

sanguin ; or l'origine leucocytaire de l'antitoxine est restée jusqu'ici une pure hypothèse.

Part de la phagocytose et part des réactions humorales dans l'immunité. — La réaction humorale et la phagocytose ont donc toutes deux leur part dans le mécanisme de l'immunité (1).

Le phagocyte, tel qu'on doit l'entendre aujourd'hui, ce n'est pas seulement le leucocyte migrateur, c'est toute cellule mésenchymateuse, y compris les cellules des revêtements endothéliaux; c'est encore la cellule épithéliale, surtout dans les cas où elle s'est adaptée à la fonction de revêtement (cellule endothéliale pulmonaire). La fonction de phagocyte est donc une fonction très générale. Si la phagocytose intervient dans la protection de l'organisme, elle n'est pas seule à jouer un rôle dans l'immunité ; car on trouve, dans les humeurs, des propriétés bactéricides et immunisantes.

Pendant longtemps, la doctrine humorale et la doctrine de la phagocytose se sont opposées l'une à l'autre. La découverte de la bactériolyse est venue fortifier la doctrine humorale. La doctrine de la phagocytose a cherché sans succès dans les leucocytes et dans la leucolyse la source de la substance bactéricide. La découverte des substances favorisant la phagocytose a rapproché les deux conceptions. Il y a donc d'abord des phénomènes de phagocytose qui jouent un rôle important dans l'immunité naturelle. Il apparaît, de plus, dans l'immunité acquise, des phénomènes humoraux distincts, indépendants de la leucolyse, indépendants même des leucocytes, car l'origine leucocytaire de l'alexine n'est pas démontrée (2). Même dans les cas où ces propriétés humorales sont frappantes et dominent la scène, la phagocytose peut intervenir utilement pour ajouter son action à celle des humeurs et englober les microbes qui ont échappé à la bactériolyse. Enfin, chez le vacciné apparaissent des substances favorisantes qui semblant agir par des phénomènes physico-chimiques, facilitent l'attachement des microbes et permettent l'englobement final.

Mécanisme de la phagocytose. Interprétation physico-chimique des phénomènes qui interviennent dans l'immunité. — Les propriétés physiques au milieu dans lequel s'exerce la phagocytose ont une grande influence sur ce phénomène. Les expériences de *Hamburger* (3) montrent, d'une manière

(1) Bordet, *Immunité*. Paris, 1920.

(2) Les propriétés humorales apparues dans l'immunité acquise ne sont pas seulement le résultat de la réaction de la cellule qui a digéré le microbe, mais aussi la réaction d'un ensemble de tissus vis-à-vis des effets des produits microbiens.

(3) Voir ch. v.

évidente, l'influence de la concentration moléculaire, l'amiboïsme des leucocytes exigeant lui-même une concentration saline déterminée du milieu.

Certains auteurs ont voulu voir dans la phagocytose même un phénomène physique. L'incorporation serait précédée d'une phase d'attraction, d'agglutination des particules étrangères à la surface du leucocyte, phénomène déterminé par la tension superficielle et l'attraction capillaire (1). Mais ces forces physiques, certaines, n'entrent pas seules en jeu ; l'interprétation n'est plus suffisante quand on voit le bourgeonnement protoplasmique et la progression du leucocyte se faire dans une direction bien déterminée (2) et surtout dans le cas de l'englobement de corps volumineux. La phagocytose reste avant tout un acte vital, un acte de mouvement cellulaire propre.

Si, au contraire, laissant de côté les phénomènes cellulaires, on ne considère que les propriétés apparues dans les humeurs, les interprétations physico-chimiques peuvent s'exercer avec plus de liberté. Ces propriétés nouvelles se manifestent par des actes d'agglomération et par des actes de désagrégation ou de dissolution : l'agglutination des microbes et des globules rouges, les phénomènes de coagulation et de précipitation d'une part — l'hémolyse, la cytolyse, la bactériolyse d'autre part, en sont des exemples caractéristiques. Or, les corps qui interviennent dans ces actions se trouvent à l'état colloïdal, à l'état d'émulsions extrêmement fines. Dans cet état, les corps n'obéissent plus seulement aux lois des équilibres chimiques, mais aussi à d'autres lois, où les phénomènes de surface jouent un rôle primordial (v. ch. IX). Les ions des électrolytes ont la propriété de se fixer sur les granules colloïdaux ; de plus, les colloïdes différents ont une grande affinité les uns pour les autres et tendent à constituer ces édifices moléculaires compliqués et instables qu'on appelle des complexes colloïdaux. Suivant la nature et la proportion du mélange, l'addition d'un colloïde à un autre pourra donner lieu à une action de précipitation ou à un acte de dissociation. Les phénomènes d'agglomération ou de dissociation que nous voyons se produire par les humeurs sont semblables en somme à ceux qui se produisent par la réaction des colloïdes entre eux. Le nombre très grand des combinaisons qu'on peut ainsi produire fait que ces actions paraissent souvent spécifiques (3).

LEUCOCYTES ET NUTRITION. FERMENTS LEUCOCYTAIRES

Les leucocytes sont capables de transformer et de digérer les

(1) Levaditi et Mutermilch, *S. de Biologie*, 18 juin 1910. D'après ces auteurs, la phase d'attraction, préparatoire, pourrait être obtenue dans des conditions où les leucocytes sont paralysés, à 0°. Dans certains cas, comme on l'a vu avec des streptocoques très virulents, le germe englobé élabore des produits leucotoxiques de sorte que le globule blanc meurt avant d'avoir digéré le microbe. Levaditi (*S. de Biologie*, 16 novembre 1918), distingue ainsi quatre phases dans le phénomène de la phagocytose : phase d'attachement (phénomène exclusivement physico-chimique), phase d'englobement (phénomène vital), phase leucotoxique (dépendant de l'activité du germe englobé), phase de digestion intracellulaire. Les récents travaux sur le mécanisme d'action des opsonines montent aussi, dans la phase préparatrice de la phagocytose, l'intervention de phénomènes d'accolement, d'adsorption, distincts de la chimiotaxie et de l'amiboïsme. Voir Bordet, *Immunité*, p. 230.

(2) Voir Comandon, *S. de Biologie*, 17 mars 1917 et *Annales Pasteur*, janvier 1920.

(3) V. Henri, *Semaine médicale*, 4 septembre 1907 ; — Tarassevitch in Gilbert et Weinberg, II, et Bordet, *l. c.*

corps qu'ils ont phagocytés, microbes, globules rouges, débris cellulaires. Cette digestion intra-cellulaire est produite à l'aide de ferments.

L'idée que les leucocytes sont capables de fabriquer des ferments et de les mettre même en liberté dans certaines conditions a d'abord été émise à propos de l'origine du fibrin-ferment dans la coagulation (1). Mais les premiers faits précis sur cette question ont été apportés par les travaux de *Portier* (2) sur les oxydases et par ceux de *Achalme* (3) sur les ferments digestifs contenus dans le pus. Dans les exsudats purulents, *Achalme* met en évidence un ferment protéolytique qui dissout la fibrine et l'albumine d'œuf coagulée et qu'il compare à la trypsine. Il ne s'agit pas là d'une action microbienne, car elle se produit avec du pus stérile. Le ferment est bien d'origine leucocytaire, car le sérum du pus est beaucoup moins actif que le magma formé par ses globules blancs. Ces constatations furent confirmées plus tard par l'étude des divers exsudats et surtout par celle du sang des leucémies (4).

Protéase leucocytaire. — La recherche du ferment protéolytique des leucocytes peut se faire avec le sang ou avec les exsudats. Le sang est reçu dans un tube à centrifuger contenant une solution d'oxalate de potasse pour empêcher la coagulation ; on ajoute 2 à 3 centimètres cubes de sang et on centrifuge. On isole les couches supérieures du culot obtenu ; on peut multiplier les centrifugations pour isoler plus parfaitement les leucocytes. Avec le sang de la myélocytémie, les leucocytes sont si nombreux que leur isolement est facile. Dans les exsudats séreux, les leucocytes sont isolés aussi par centrifugation immédiate, sans défibrination préalable. Le culot obtenu est dilué dans l'eau salée à 8 p. 1000; le pus est traité de la même façon.

Les meilleurs milieux pour la recherche du ferment sont le sérum de bœuf coagulé par la chaleur, coulé en boîtes de Petri ou en tubes inclinés, et l'ovalbumine coagulée. Celle-ci, recueillie aseptiquement, est coulée en boîtes ou en tubes inclinés comme le sérum et coagulée à 80° pendant 2 heures. Les tubes sont fermés avec des bouchons de caoutchouc. Des gouttelettes de l'émulsion de leucocytes sont déposées à la surface de l'albumine ; après 24 à 48 heures de séjour à l'étuve à 52-55°, l'action du ferment se manifeste par la production de cupules résultant de la liquéfaction due à la peptonisation.

Le ferment protéolytique mis ainsi en évidence effectue une digestion complète

(1) Voir ch. VIII.

(2) PORTIER, Th. Paris, 1897.

(3) ACHALME, *S. de Biologie*, 1er juillet 1899.

(4) ERBEN, *Münchener med. Woch.*, 1906 et *Zentralblatt f. innere medicin*, 1907; — OPIE, *J. of exp. med.*, 1905 et 1906; — MÜLLER et JOCHMANN, *Münch. med. Woch.*, 1906; — FIESSINGER et MARIE, *S. de biologie*, 29 mai et 5 juin 1909; *J. de phys. et de path. gén.*, juillet et septembre 1909; *Archives des maladies du cœur*, octobre 1909. Les ferments digestifs des leucocytes, Paris, 1910; — FIESSINGER, La protéase et la lipase des leucocytes, in GILBERT et WEINBERG, *Traité du sang*.

et transforme les albuminoïdes jusqu'aux peptones et aux acides aminés. Il liquéfie la gélatine, digère la fibrine crue, le sérum coagulé, les hématies, la caséine du lait cuit et attaque la peptone de Witte. Il est très comparable à la trypsine. Il résiste à l'action du formol. Il paraît spécial aux exsudats contenant des leucocytes polynucléaires, au pus à polynucléaires, aux émulsions de moelle osseuse, au sang de la myélocytémie. Il n'existe pas dans les exsudats séreux à lymphocytes (1).

Le ferment protéolytique des leucocytes n'est pas le résultat de l'autolyse de l'exsudat; c'est un ferment préformé dont on peut obtenir l'action *in vitro* avant toute autolyse. Mais on n'a pas encore démontré qu'il agisse réellement *in vivo*. Certains faits parlent cependant en faveur de cette hypothèse. Les plus intéressants sont ceux qui concernent les expériences dans lesquelles on a obtenu la digestion d'albumine d'œuf, de fragments de fibrine, introduits aseptiquement sous la peau d'un animal. Il est peu vraisemblable que le ferment des polynucléaires soit un adjuvant des glandes digestives ; mais il est infiniment probable qu'il intervient dans tous les cas où l'organisme doit absorber ou faire disparaître des substances albuminoïdes étrangères (résorption du sang épanché, résorption du tissu osseux dans l'ostéogénèse normale, histolyse larvaire, résorption des exsudats fibrineux pathologiques, etc.).

Lipase leucocytaire. — Les leucocytes paraissent capables aussi de fabriquer une lipase, c'est-à-dire un ferment réalisant l'émulsion, puis le dédoublement des graisses neutres en glycérine et en acide gras. *Ranvier* (2), en 1894, avait montré que la lymphe est capable d'émulsionner les graisses. *Achalme*, en 1899 (3), avait trouvé une lipase dans le pus. Des observations plus précises ont été apportées par *Poulain* (4). Il vit que pendant la période digestive, la graisse arrivée dans les sinus des ganglions mésentériques s'y transforme sous l'action d'une lipase identique à la lipase du sérum. Cette action lipasique appartient aux exsudats à lymphocytes alors qu'on ne l'obtient pas avec les exsudats à polynucléaires. Pour la mettre en évidence, on peut se servir d'un milieu solide, par exemple, de la cire jaune d'abeille recommandée par *Fiessinger et Marie* (5), fusible à 60° et coulée en boîtes de Petri. Les gouttelettes d'exsudat sont déposées à la surface de la cire et le tout est abandonné 24 à 48 heures à l'étuve à 55°. La digestion se manifeste par des dépressions d'aspect grenu, à bords soulevés.

Les milieux liquides permettent une appréciation plus exacte de cette réaction, parce qu'on peut doser les acides gras mis en liberté. Les plus employés sont la monobutyrine (6) et la graisse de beurre neutre (7).

Le ferment lipasique a été trouvé surtout dans les exsudats séreux à lymphocytes, dans le pus tuberculeux, les ganglions et la rate. Les exsudats à polynucléaires, le sang de la myélocytémie donnent des résultats négatifs ou incomplets.

(1) Il ne semble pas exister non plus dans le sang de la lymphocytémie et des leucémies à myéloblastes et à leucoblastes. Voir Jochmann et Blühdorn, *Folia hæmatologica*, XII, 1911 ; — Gorjaew, *Folia hæmatologica*, XVI, 1913 ; — Fiessinger et Broussolle, *S. méd. des hôpitaux*, 18 février 1921.

(2) Ranvier, *C. R. Ac. des sciences*, 19 mars 1894.

(3) Achalme, *S. de Biologie*, 1er juillet 1899.

(4) Poulain, Th. Paris, 1902.

(5) Fiessinger et Marie, *S. de Biologie*, 10 et 17 juillet 1909.

(6) Hanriot, *S. de Biologie*, 15 février 1902 ; — Clerc, Th. Paris, 1902.

(7) Fiessinger et Marie, *l. c.*

Comme la protéase, la lipase leucocytaire préexisterait dans le leucocyte vivant. Il est possible qu'elle joue un rôle dans la transformation des graisses absorbées au niveau des ganglions mésentériques. Certains auteurs ont voulu y voir l'origine de l'alexine du sérum sanguin (1) ; mais c'est là encore une hypothèse non démontrée.

On a cherché à tirer de la connaissance de ces ferments leucocytaires des renseignements applicables au diagnostic clinique. Il résulte des recherches de *Fiessinger* et *Marie* que pour les pleurésies séro-fibrineuses primitives tuberculeuses ou les pleurésies secondaires des phtisiques, pour l'hydrothorax, l'ascite cirrhotique, le pouvoir protéolytique est négatif et le pouvoir lipasique inconstant. Dans les pleurésies suppurées aiguës non tuberculeuses, dans les méningites cérébro-spinales suppurées, le pouvoir protéolytique est marqué, le pouvoir lipolytique nul. Le pouvoir protéolytique appartient ainsi exclusivement aux exsudats à polynucléaires et il fait défaut dans les exsudats à lymphocytes. Quant au pouvoir lipolytique, il est toujours négatif avec les exsudats à polynucléaires, positif mais inconstant lorsque les lymphocytes dominent.

Oxydases leucocytaires. — Le sang contient un ferment oxydant (2). D'après les recherches de *Portier* (3) ce ferment paraît provenir des leucocytes. Si, en effet, on centrifuge du sang auquel on a ajouté de l'oxalate de potasse pour empêcher la coagulation, c'est avec les parties superficielles du culot, c'est-à-dire avec la couche de leucocytes (4) qu'on obtient les réactions des oxydases (coloration bleue avec la teinture de gaïac due à l'oxydation de l'acide gaïaconique). Mais il n'est pas certain que ces oxydases préexistent dans le sang et les tissus des animaux. D'après *Portier*, elles proviendraient de la destruction des leucocytes (5). On sait depuis longtemps que le pus donne les réactions de la teinture de gaïac.

La localisation du ferment oxydant dans les leucocytes peut être mise en évidence au microscope par la synthèse de l'indophénol (6). Cette réaction est basée sur la formation, par synthèse, sous l'influence d'un ferment oxydant, d'une substance bleue du groupe de l'indophénol, lorsqu'on mélange à parties égales une solution aqueuse de naphtol α à 1 p. 100 (7) et une solution aqueuse à 1 p. 100 de diméthylphénylendiamine. Le tissu contenant les leucocytes est fixé au formol et les coupes faites par congélation. Les leucocytes polynucléaires apparaissent criblés de grains bleus foncés qui indiquent la présence du ferment oxydant ; les lymphocytes restent incolores. Cette réaction peut être faite aussi sur des lames de sang séchées et non fixées (8).

(1) Froin, *Hématolyse et hématogénèse*, Paris, 1910.

(2) Abelous et Biarnès, *S. de Biologie*, 1894, 1897.

(3) Portier, Th. Paris, 1897, et *S. de Biologie*, 23 avril 1898.

(4) Qui contient aussi les globulins (voir ch. VIII).

(5) Dans le sang coagulé, l'oxydase se fixe en partie sur la fibrine. Ce serait la destruction des leucocytes qui expliquerait que la fibrine du caillot soit riche en oxydase. Mais les leucocytes ne sont pas détruits pendant la coagulation.

(6) Winkler, *Folia hæmatologica*, 1907 et 1912 ; — Schultze, *Münchener med. Woch.*, 1909 et 1910, et *Ziegler's Beiträge*, XLV, 1909 ; — Nakano, *Folia hæmatologica*, XV, 1913.

(7) Préparée à chaud et à laquelle on ajoute après refroidissement, juste assez de potasse pour dissoudre entièrement le naphtol.

(8) Fiessinger et Roudowska, *S. de Biologie*, 23 décembre 1911, et *Archives de méd. exp.*, XXIV, 1912 ; — Fiessinger, *S. de Biologie*, 1919, et *J. méd. français*, 1920 ; — Fauré-Frémiet, *Ann. d'hygiène publique et de méd. légale*, 1920.

On avait d'abord cru voir dans les oxydases sanguines et leucocytaires des ferments capables de produire les oxydations qui se passent dans l'intimité des tissus (1); mais jusqu'ici ces ferments se sont montrés incapables de cette action (2). *Portier* leur attribue un rôle dans la défense de l'organisme contre les microbes ; ils seraient capables d'activer la phagocytose ; mais cette hypothèse n'est pas démontrée.

Les oxydases paraissent appartenir seulement aux leucocytes granuleux. Les lymphocytes, leucoblastes et myéloblastes ne donnent pas ces réactions.

On peut aussi mettre en évidence, dans certains leucocytes, des oxydases indirectes (peroxydases) qui empruntent l'oxygène, non plus au milieu ambiant, mais à des corps oxydés. Ces ferments seraient localisés sur les granulations des polynucléaires et des éosinophiles. Ils persistent dans les leucocytes après la mort de la cellule. Les granulations éosinophiles (α) donnent la réaction plus fortement que les granulations neutrophiles (ε) et amphophiles (β).

On recherche cette réaction avec la benzidine (3). On prépare une solution de benzidine à 2 p. 100 dans l'alcool absolu. On fait agir le réactif pendant 10 à 15 minutes sur la lame de sang sèche et non fixée on le remplace par de l'eau oxygénée très diluée; on lave à l'eau distillée et on sèche. On colore accessoirement les noyaux avec un bleu basique ou la safranine. Les leucocytes polynucléaires et éosinophiles apparaissent remplis de granulations colorées en bleu ou en brun.

Comme la réaction des oxydases directes, la réaction des peroxydases paraît appartenir seulement aux leucocytes et aux myélocytes granuleux. Elle est moins sensible que la réaction de l'indophénol et a plus de valeur. Les lymphocytes, myéloblastes et leucoblastes ne la donnent pas. Malgré des résultats contraires, qui sont probablement dus au mélange d'autres formes leucocytaires, la réaction est en général négative avec le sang des leucémies aiguës à cellules indifférenciées (myéloblastes et leucoblastes) (4). Elle est négative dans la lymphocytémie et positive dans la myélocytémie.

On a attribué encore aux leucocytes la sécrétion d'autres ferments : ferment glycolytique, plasmase, ferment autolytique faisant apparaître les granulations lipoïdes, ferment capable de dissocier la lécithine (lipoïdase ou lécithinase). Ce dernier ferment est recherché par hydrolyse de la lécithine et libération de la choline qu'on caractérise, après l'action de l'iode, par la formation des cristaux de

(1) En appliquant à l'étude microscopique des tissus, des substances qui par oxydation donnent du bleu de méthylène, Unna est arrivé à placer dans le noyau des cellules le siège principal des oxydations tissulaires, tandis que le protoplasma serait réducteur. Dans le noyau, les actions seraient dues à un catalyseur ferrugineux existant dans la chromatine. Dans les globules rouges sans noyau, l'hémoglobine possède la capacité de fixation de l'oxygène analogue à celle du noyau. Dans le plasma sanguin, et dans le tissu conjonctif, les leucocytes interviendraient par leurs ferments dans les phénomènes intimes d'oxydation. Dans le tissu conjonctif, Unna a attribué surtout cette fonction aux mastzelles dont les grains ont, vis-à-vis du bleu de méthylène, les mêmes réactions que les noyaux. Voir Unna, *Archiv f. mik. Anatomie*, LXXVIII, 1911, et LXXXVII, 1916.

(2) Lambling, *Biochimie*, 3e éd.

(3) Fiessinger et Roudowska, *Archives de méd. exp.*, XXIV, 1912 ; — Fiessinger, *J. méd. français*, 1920 ; — Roudowska, Th. Paris, 1914 ; — Broussolle, Th. Paris, 1921.

(4) Jochmann et Blühdorn, *Folia hæmatologica*, XII, 1911 ; — Fiessinger et Broussolle, *Soc. méd. des hôpitaux*, 18 février 1921 ; — Fiessinger et Mathieu, *J. de Phys.*, 1922.

Florence (1). Ce ferment, comme la protéase et les peroxydases, appartient aux leucocytes et myélocytes granuleux et n'appartient ni aux lymphocytes, leucoblastes et myéloblastes.

Le sang et les tissus d'un grand nombre d'invertébrés contiennent aussi des ferments (oxydases, ferments protéolytiques, lipases) dont on a attribué l'origine aux leucocytes. Le ferment cérolytique de la chenille de la teigne des ruches, qui se nourrit de cire, proviendrait des amibocytes, et c'est à la présence dans le sang de cette diastase voisine des lipases que cet insecte devrait sa faculté d'assimiler la cire et en même temps son immunité contre la tuberculose (2).

Rôle des leucocytes dans les transformations tissulaires. Disparition des éléments nécrosés. Histolyse larvaire. Histogénèse. — La phagocytose ne s'applique pas qu'aux microbes. Les leucocytes absorbent aussi les corps étrangers. Le cas qui a été le plus souvent étudié est celui de la résorption des globules rouges dans les hémorragies. A vrai dire, les leucocytes partagent cette fonction avec les cellules conjonctives et les cellules endothéliales qui jouent souvent un rôle aussi important que les cellules migratrices. Les leucocytes interviennent aussi dans la résorption des éléments nécrosés. Des phénomènes analogues peuvent se voir pendant l'histogénèse, pendant l'édification de l'os, pendant la formation du tissu conjonctif, où ils se passent surtout dans les cellules conjonctives (3).

C'est dans l'histolyse larvaire que ces phénomènes ont été le plus étudiés. La phagocytose prend part à la disparition des organes larvaires, mais elle n'a probablement pas l'importance qui lui avait été d'abord attribuée (4). On l'observe surtout chez les Insectes, dans les espèces dont les métamorphoses ont une évolution rapide et s'accompagnent de modifications profondes (5). Certains auteurs refusent aux globules blancs, dans ces phénomènes, un rôle destructeur et ne veulent leur attribuer qu'un rôle de transport. Cependant la digestion intra-cellulaire a été bien observée. On discute encore pour savoir si les éléments qui disparaissent sont incorporés par les phagocytes avant ou après leur dégénérescence ; il est bien probable que ces différents modes de disparition peuvent se présenter, mais que le plus souvent, les phagocytes ne s'attaquent qu'à des éléments ayant subi un début de dégénérescence. C'est ce qu'on voit, chez l'homme, dans certaines tumeurs malignes, où les leucocytes attaquent les cellules cancéreuses en train de mourir soit par leur évolution naturelle, soit par l'action des radiations. Il est possible enfin que, dans certains cas, la destruction des éléments, au cours de l'histolyse larvaire, puisse se faire complètement, sans l'intervention de la phagocytose par une sorte de lyse d'origine humorale.

(1) Fiessinger et Clogne, *C. R. Ac. des sciences*, 19 novembre 1917; — Fiessinger et Broussolle, *S. méd. des hôpitaux*, 18 février 1921. On considère aujourd'hui les cristaux de Florence comme formés par la choline ou ses dérivés. La choline ne préexiste pas dans le sérum sanguin; elle provient vraisemblablement de la décomposition de la lécithine. Voir aussi Claude et Blanchetière, *J. de Phys.*, IX, 1907.

(2) Metalnikoff, *S. de Biologie*, 1920; — Fiessinger, *S. de Biologie*, 1920.

(3) Zachariadès, *S. de Biologie*, 19 février 1898.

(4) Henneguy, *les Insectes*, Paris, 1901.

(5) Ch. Pérez, Th. sc., 1902, *Bull. sc. de la France et de la Belgique*, 1903; *Archives de zool. exp.*, 1910 et *Mémoire Ac. roy. de Belgique*, Bruxelles, 1911 ; — Vaney, *Annales de l'Un.*, Lyon, 1902; — Mercier, *Archives de zool. exp.*, 1906. Voyez aussi pour les Batraciens, Guieysse, *Archives d'An. micr.*, VII, 1901.

Rôle des leucocytes dans les échanges nutritifs. Absorption. Élimination. — Les leucocytes interviennent très vraisemblablement dans les échanges nutritifs; mais on ne sait pas encore exactement dans quelle mesure ils participent à ces phénomènes. L'hypothèse suivant laquelle ils jouent un rôle dans la nutrition des tissus a été émise pour la première fois par *Ranvier* (1), qui comparait les globules blancs à des glandes unicellulaires mobiles, capables de tirer du plasma lymphatique et interstitiel, des matériaux nutritifs, de les transformer par leur activité propre et de les rendre ensuite aux tissus sous une autre forme, comme le fait par exemple la cellule hépatique pour le glycogène. L'observation des clasmatocytes (voir ch. VI) et des cellules migratrices venaient confirmer cette manière de voir; la diapédèse et la migration étaient, dans les tissus non vascularisés comme la cornée, un prolongement, un complément de la circulation sanguine.

Nous avons montré plus haut (ch. V) que les leucocytes migrateurs sont capables d'abandonner des fragments de leur protoplasma; ces fragments, dans les tissus, sont vraisemblablement résorbés comme matériaux nutritifs. S'agit-il là d'un phénomène exceptionnel, ou bien, comme le pensait *Ranvier* pour la cicatrisation, les leucocytes sont-ils capables de servir directement de matérial nutritif aux tissus? C'est ce qu'on ne sait pas encore (2).

La découverte des ferments leucocytaires est venue apporter un argument aux idées de *Ranvier*. Ces diastases, dont *Metchnikoff* faisait le facteur principal de la disparition des microbes, sont capables aussi de digérer, de transformer des matériaux nutritifs. On a voulu localiser ces ferments dans les granulations leucocytaires. L'afflux des leucocytes éosinophiles dans la muqueuse intestinale pendant la période digestive a fait supposer qu'ils participaient à la sécrétion du suc intestinal (3). Enfin, certains faits permettent de penser que les leucocytes peuvent jouer un rôle dans l'absorption et l'élimination.

La présence, dans l'intestin, d'un grand nombre de leucocytes migrateurs, distincts des petites cellules du tissu lymphoïde, a conduit depuis longtemps les observateurs à croire qu'ils étaient capables de jouer un rôle dans l'absorption et qu'en particulier, ils transportaient les granulations graisseuses de la cellule épithéliale au chylifère de la villosité. Il est certain que chez les animaux sacrifiés pendant la digestion intestinale, on trouve des grains de graisse dans les leucocytes de la villosité. Mais le rôle que jouent les leucocytes dans l'absorption de la graisse au niveau de la villosité est secondaire. La graisse est saponifiée dans l'intestin après avoir été émulsionnée; elle ne pénètre dans la muqueuse qu'après son dédoublement et paraît être reconstituée après sa pénétration. On nourrit un rat exclusivement avec des noix et de l'eau, pendant un ou deux jours et on le sacrifie en pleine digestion. On trouve dans les cellules épithéliales cylindriques de la villosité de fines granulations sphériques qui s'accumulent autour du noyau

(1) Ranvier, *Archives de physiologie*, 1875.

(2) Les leucocytes constituent une partie de l'embryotrophe, c'est-à-dire du matériel cellulaire qui sert de nourriture à l'œuf des Mammifères, chez certaines espèces tout au moins, dans les premières phases de son développement (voir ch. XVIII). Pour les modifications des leucocytes et du tissu lymphoïde dans l'inanition, voir ch. XVIII. D'après les recherches de Delezenne (*S. de Biologie*, 8 mars 1902), les leucocytes des ganglions lymphatiques et des plaques de Peyer contiendraient une diastase favorisant la digestion tryptique des matières albuminoïdes.

(3) Simon, Th. Paris, 1904.

et sont rejetées à l'état de gouttelettes plus grosses et parfois confluentes au-dessous de l'épithélium ; les cellules lymphatiques contiennent des granulations graisseuses ; quant aux chylifères, ils contiennent une huile non émulsionnée (1). Il résulte de ces observations que la graisse prise par les cellules épithéliales est rejetée par elles. Dans l'intérieur du chylifère, elle est reconstituée à l'état d'huile non émulsionnée. Pour qu'elle arrive dans le sang à l'état de chyle, il faut qu'elle soit de nouveau émulsionnée. Ici, la lymphe, qui a le pouvoir d'émulsionner la graisse, les leucocytes et les ganglions mésentériques, par leurs ferments, sont capables d'intervenir (2). Les leucocytes ne paraissent avoir aucune action dans l'absorption des albuminoïdes et des hydrates de carbone.

On a voulu faire jouer aux leucocytes, dans la fonction du placenta, un rôle analogue de vecteur de certaines substances ; mais cette manière de voir n'est pas justifiée (3).

Si les leucocytes ne jouent, dans l'absorption intestinale, qu'un rôle très secondaire, ils ont une action plus évidente dans l'absorption des substances alimentaires, digestibles, qui ont été introduites artificiellement dans le tissu conjonctif. On a essayé, en effet, d'introduire des substances alimentaires dans les tissus. Il résulte de ces expériences que les graisses sont en partie absorbées et que les substances hydrocarbonées et les albumines ne sont absorbées que d'une manière beaucoup trop insuffisante pour que ce procédé puisse être utilisé en clinique. Ces différentes substances sont absorbées par les cellules et lentement transformées. Le lait, le blanc d'œuf, les émulsions de foie, le vitellus, le sang, injectés dans le péritoine et dans le tissu conjonctif sont absorbés par les leucocytes et les cellules endothéliales et conjonctives. Les propriétés nouvelles apparues dans le sérum sanguin au cours des expériences d'immunité (agglutinines, bactériolysines, cytolysines, hémolysines), ont été considérées par *Metchnikoff* comme la conséquence directe de la digestion intracellulaire des substances injectées. Toutefois, dans ces essais d'alimentation parentérale, les leucocytes ne jouent qu'un rôle absolument accessoire.

Les substances dont nous venons de parler sont à l'état de corpuscules figurés ; elles sont absorbées comme telles par les cellules. Leur présence provoque un afflux leucocytaire en même temps qu'une inflammation des cellules endothéliales qui les transforment et les rendent aptes à un rôle nouveau (voir ch. VI). Un certain nombre d'expériences tendent à nous montrer que les leucocytes sont capables aussi d'absorber des substances dissoutes (fer, mercure, iode, salicylate de soude), ou des solutions colloïdales (gélatine, sérum sanguin, etc.) (4).

Le phagocytose des particules étrangères peut avoir un rôle excréteur, éliminateur. Chez beaucoup d'invertébrés (Lamellibranches, Échinodermes), les leucocytes qui se sont chargés de déchets cellulaires ou de particules étrangères que l'on a injectées en suspension dans le corps de l'animal, émigrent jusque dans l'épithélium de revêtement ou dans celui du tube digestif, et sortent de l'organisme (5).

(1) Ranvier, *C. R. de l'Ac. des sciences*, 19 mars 1894.

(2) Poulain, Th. Paris, 1902.

(3) Hofbauer, *Grundzüge einer Biologie der menschlichen Plazenta mit besonderer Berücksichtigung der Fragen der fötalen Ernährung*, Wien et Leipsig, 1905.

(4) Arnozan et Montel, *XIIIe Congrès int. médecine*, Paris, 1900 ; — Carles, Th. Bordeaux, 1902, et *Réunion biologique de Bordeaux*, 1er février 1910 ; — Labbé et Lortat-Jacob, *S. de Biologie*, 28 juin 1902.

(5) De Bruyne, *Archives de biologie*, XIV, 1896 ; — Cuénot, *Archives d'an. micr.*, 1897.

Chez les Oligochètes (lombric), le cœlome communique avec l'extérieur par les pores dorsaux qui sont une voie d'élimination pour les gros parasites entourés par les phagocytes (1). Chez ces animaux, certains leucocytes ont la propriété de fixer avec élections les matières colorantes solubles. Par analogie, certains auteurs ont attribué aux leucocytes, chez les Vertébrés et même chez les Mammifères, un rôle éliminateur des substances toxiques (2). Les leucocytes attirés dans le sang par la substance toxique, l'absorberaient, la conduiraient aux organes d'excrétion (peau, reins, etc.) et en débarrasseraient ainsi l'organisme. Beaucoup d'inflammations cutanées ne seraient que la conséquence de cette fonction, qui du reste n'est pas encore démontrée. Il est possible que les leucocytes jouent effectivement un pareil rôle dans la suppuration. On ignore encore dans quelle mesure les abcès de fixation provoqués, dans un but thérapeutique, par des substances irritantes (essence de térébenthine), éliminent les déchets cellulaires et les substances toxiques.

Le sang de certains insectes contient des cellules sphéruleuses voisines des néphrophagocytes, dont les sphérules peuvent être mises en liberté dans le plasma sanguin (3). Il ne semble pas s'agir là d'une fonction d'élimination; ces cellules n'éliminent pas le carmin. Les sphérules ne seraient pas non plus des produits de réserve; elles représenteraient plutôt des ferments figurés.

(1) Voir ch. v.
(2) Spillmann et Bruntz, *Archives de méd. exp.*, 1911.
(3) Hollande, *Archives de Zoologie exp.*, 1909 et 1911.

CHAPITRE VIII

GLOBULINS. CELLULES FUSIFORMES PHÉNOMÈNES HISTOLOGIQUES DE LA COAGULATION ULTRA-MICROSCOPIE. PLASMA ET SÉRUM

A côté des hématies et des leucocytes, le sang des Mammifères contient d'autres éléments : les *globulins* de *Donné* (1), décrits encore sous les noms d'*hématoblastes* (2) et de *plaquettes* (3). Dans une préparation de sang frais, ils apparaissent sous forme de granulations d'un diamètre voisin de 3 μ, incolores, de structure homogène, d'une réfringence un peu moindre que celle des leucocytes. Leur forme paraît irrégulièrement arrondie ; leur contour est parfois anguleux. Ils adhèrent facilement à la surface de la lame de verre. Lorsque les globules rouges ont formé des piles, groupées en un réseau, les globulins se trouvent dans les espaces de plasma, à côté des leucocytes auxquels ils sont souvent accolés. Ils ne restent pas isolés et se réunissent en amas. Si on fait passer sous la lamelle de l'eau salée à 8 p. 1.000 contenant un peu de violet de méthyle, les globulins prennent une teinte violet pâle et leur contour apparaît anguleux. Comme les leucocytes, et contrairement aux hématies, ils ne disparaissent ni dans l'eau distillée ni dans les solutions faibles d'acide acétique. Dans le sang frais, leurs contours s'effacent et finissent par devenir indistincts. Une bonne manière de les observer est de recevoir la goutte de sang dans l'eau salée à 8 p. 1.000 ou mieux dans le liquide de Marcano. On observe en chambre humide. Lorsque les globulins flottent, ils apparaissent souvent allongés, en forme de grain de blé. Si on ajoute au liquide de Marcano un peu de

(1) Donné, *Cours de microscopie*, Paris, 1844 ; — *C. R. de l'Ac. des sc.*, 7 mars 1842.
(2) Hayem, *C. R. Ac. des sc.*, 31 décembre 1877, et *Du Sang*, Paris, 1889.
(3) Bizzozero, *Archives italiennes de biologie*, 1882.

violet de méthyle, les globulins sont colorés en violet pâle et les leucocytes en violet plus foncé. On peut aussi colorer les globulins en coloration vitale, avec le bleu crésyl brillant ou le rouge neutre.

Dans les préparations de sang fixées par les vapeurs d'acide osmique agissant sur la couche de sang étalée et non desséchée, les globulins apparaissent, soit isolés, soit plutôt groupés en petits amas dans lesquels ils sont bien distincts. Leur contour est irrégulièrement arrondi ou plus souvent ovalaire ; leur substance apparaît homogène et légèrement colorée par la plupart des couleurs nucléaires, mais d'une manière beaucoup moins intense que la chromatine. Les préparations obtenues par dessiccation donnent des résultats comparables, mais les globulins y sont moins distincts, leurs contours sont moins nettement limités et ils sont moins colorés.

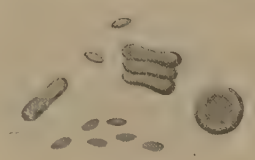


Fig. 252. — Capillaire de l'aile de la chauve-souris. Sang examiné pendant la circulation. Hématies et globulins. 1.000 diam.

L'emploi des réactifs colorants qui contiennent l'éosinate d'azur (Giemsa, etc.) permet de colorer, au centre des globulins, de fines granulations rougeâtres ou violacées. Cette réaction très nette a permis de rapprocher cette substance granuleuse de la chromatine des Protistes. Ces grains n'ont aucune affinité particulière pour la plupart des colorants nucléaires (safranine, vert de méthyle, hématoxyline). Ils apparaissent assez nettement lorsque le sang a été fixé à l'état frais par un réactif contenant de l'acide acétique. On peut les colorer par l'hématoxyline au fer après fixation du sang frais par le sublimé acétique. On les voit aussi dans la plupart des cas où la substance des globulins a été altérée ; ils semblent plus résistants que la substance qui les entoure.

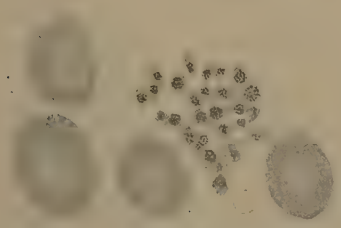


Fig. 253. — Sang d'homme. Vapeurs osmiques. Giemsa. Hématies et globulins. 1.500 diam.

La fixation du sang frais par sédimentation dans une solution d'acide osmique à 1 p. 100 ou dans une solution de formol à 10 p. 100 (1), permet d'obtenir les contours des globulins mieux fixés que par les méthodes précédentes : ils apparaissent alors ovalaires, nettement limités, tandis que sur les préparations desséchées, ils sont souvent réunis en masses.

(1) A laquelle il est bon d'ajouter 1 p. 100 de NaCl.

La facilité avec laquelle les globulins s'altèrent dans le sang frais et la difficulté de les obtenir bien fixés font qu'ils ont été souvent confondus avec des produits de destruction de leucocytes et d'hématies, ce qui a compliqué le problème de leur origine et ce qui a même permis de mettre en doute leur préexistence dans le sang circulant. Cependant, il ne peut plus y avoir à ce sujet de discussions, puisqu'on peut les observer dans les vaisseaux de l'animal vivant.

Fig. 254. — Globulins de l'homme dans le plasma pur. Un globule rouge représenté comme terme de comparaison. D'après Aynaud.

Observation des globulins « in vivo ». — L'objet le plus favorable est l'aile de chauve-souris (1). L'expérience sera réalisée comme nous l'avons indiqué plus haut à propos des hématies. On choisit un point où la circulation est lente et particulièrement l'abouchement d'un capillaire dans une veinule. Au premier abord, on ne voit que les globules rouges, nombreux et formant des piles. Mais en observant avec attention le plasma, on ne tarde pas à y apercevoir, en très grand nombre, des corps incolores, dont la réfringence est très supérieure à celle du liquide sanguin. Leur forme est allongée, à bords convexes, en grains de blé. Leur consistance paraît molle, fluide, comme celle des hématies ; un très petit nombre apparaissent ovalaires ou arrondis ; on peut penser que ces derniers sont des globulins vus de face et qu'ils ont ainsi la forme de disques minces légèrement biconvexes. Si cette manière de voir est exacte, il faudrait alors admettre qu'en suspension, ils se présentent toujours à l'observateur, de profil, par la tranche (2).

Déformations des globulins. — Pas plus *in vivo* que *in vitro*, les globulins ne présentent de véritables mouvements amiboïdes. Quelques auteurs leur en ont cependant décrit (3). Mais la forme étoilée qu'ils prennent dans certaines conditions n'est pas l'indice de véritables mouvements propres ; il n'est pas démontré qu'elle soit l'expression de leur vitalité et il est beaucoup plus probable qu'il s'agit là d'une altération. Cette altération peut se produire spontanément dans le sang frais, surtout si la préparation est portée à une température de 45°. Elle se produit aussitôt par l'action de l'eau et des solutions

(1) Bizzozero, *Gazzetta degli ospedali*, 1884, et *Archives italiennes de biologie*, XVI, 1891 ; — Laker, *Virchow's Archiv*, CXVI, 1889. — Jolly, *Archives d'an. micr.*, XI, juin 1909.

(2) D'après ce que nous avons dit plus haut des hématies des Camélieus, on pourrait aussi supposer que les globulins ont la forme de disques très minces, ayant, lorsqu'ils flottent, une tendance à s'enrouler sur eux-mêmes.

(3) Detjeen (*Virchow's Archiv*, CLXIV, 1901) a recommandé une technique spéciale qui permettrait de voir les mouvements : elle consiste à déposer le sang dans une chambre humide à la surface d'une solution d'agar coagulé contenant du chlorure de sodium, du métaphosphate de soude et du biphosphate de potassium. Dans ces conditions, on voit les globulins pousser des prolongements et prendre la forme étoilée.

salées hypotoniques ou même isotoniques. Lorsque la coagulation a commencé à se faire, on voit les angles de beaucoup de globulins se continuer avec un filament de fibrine. Dans les préparations fixées et colorées, les globulins altérés peuvent se présenter sous un aspect effilé, flagellé, capable de simuler grossièrement des hématozoaires.

Fig. 255. — Sang de chien, citraté à 1 p. 100 et conservé 48 heures à la température du laboratoire. Forme étoilée des globulins. D'après Aynaud.

Observation des globulins dans des conditions qui empêchent ou retardent la coagulation. — L'altérabilité très grande et très rapide des globulins dans le sang frais *in vitro*, et leurs relations, au moins apparentes, avec le réseau fibrineux dans le sang coagulé, a donné l'idée de les observer dans un sang dont la coagulation serait empêchée ou retardée. On peut réaliser ces conditions de différentes façons, soit par l'addition au sang de substances anticoagulantes, soit en lubrifiant la surface du verre par un corps gras indifférent. Il ne faudrait pas toutefois s'illusionner sur l'innocuité de ces méthodes ; leur valeur n'est pas absolue, leur emploi ne peut être exclusif et les résultats qu'elles donnent ne constituent que des éléments de comparaison. La manière de recueillir le sang a une grande importance ; il faut dans tous les cas, le recueillir bien proprement, et en évitant autant que possible qu'il ne soit mélangé au suc des tissus. On peut y arriver par la piqûre d'une veine superficielle, dénudée au besoin chez l'animal. Chez l'homme, la piqûre du dos du doigt, lorsque la peau est mince, sèche, sans trace d'œdème, réalise à peu près ces conditions.

Fig. 256. — Sang humain recueilli dans la veine et fixé par une solution osmique et citratée. Coloration de Giemsa. Un globule rouge et trois globulins. D'après Aynaud.

La méthode de *Aynaud* (1) consiste essentiellement à étudier les globulins dans du sang recueilli par ponction d'un gros vaisseau, à l'abri du contact de la plaie. La goutte de sang est reçue à la surface d'une lamelle vaselinée et observée en goutte pendante. En se servant de trocarts vaselinés, de pipettes et de tubes paraffinés, on peut ainsi manipuler de grandes quantités de sang. On choisit de préférence un animal dont le sang se coagule très lentement, cheval ou âne ; la veine jugulaire est ponctionnée avec un trocart vaseliné. On recueille le sang dans des vases paraffinés où il sédimente lentement. A l'aide d'une pipette paraffinée, on recueille la couche superficielle de plasma qui contient encore des globules rouges, mais surtout des leucocytes et des globulins. On en dépose une goutte à la surface d'une lamelle vaselinée qu'on retourne et qu'on applique sur les bords d'une chambre humide profonde de façon à l'observer en goutte pendante et à l'abri du contact du verre. Les globulins apparaissent nombreux ;

(1) Achard et Aynaud, *S. de biologie*, 7 décembre 1907 ; — Aynaud, *le Globulin des mammifères*. Th. Paris, 1909 ; — Aynaud, les Globulins, *in* Gilbert et Weinberg, *Traité du sang*, I, p. 410, et *Annales Pasteur*, janvier 1911.

presque tous ont la forme allongée, en grain de blé, que nous avons observée dans les vaisseaux de l'aile de la chauve-souris. Ils paraissent homogènes, peu réfringents ; dans la goutte pendante, ils tombent plus lentement que les globules rouges et que les globules blancs, de sorte que les couches superficielles de la préparation les contiennent presque exclusivement. Pendant qu'ils tombent, ils présentent un léger et perpétuel mouvement d'oscillation. Ils n'ont ici aucune tendance à s'accoler ni entre eux ni aux autres éléments.

Fig. 257. — Sang humain citraté à 5 p. 1.000. Globulins. D'après Aynaud.

On peut faire des observations analogues avec le sang de l'homme, recueilli par piqûre d'une veine du pli du coude avec une aiguille d'acier adaptée à une seringue en verre chargée d'une solution de citrate de soude à 10 p. 100 dans l'eau distillée. La goutte de sang est déposée directement sur la lamelle vaselinée ou bien le sang est reçu dans un tube paraffiné.

Qu'il s'agisse de sang d'homme ou de sang de cheval ou d'âne, moins coagulable, la précipitation de la fibrine finit toujours par se produire et l'on voit survenir les altérations des globulins que nous avons décrites plus haut. Les formes normales et les formes altérées peuvent être fixées par les vapeurs osmiques. *Aynaud* a recommandé, pour la fixation des formes normales, les mélanges formol-citrate de soude et acide osmique-citrate de soude. La goutte de sang est reçue directement dans 10 cc. du liquide fixateur (1). On centrifuge ou on sédimente. Le culot est étalé sur lame et coloré. Ainsi obtenus, les globulins apparaissent arrondis et de structure homogène.

Fig. 258. — Sang de chien oxalaté à 2 p. 1.000. Agglutination des globulins par la peptone. D'après Aynaud.

Action des anticoagulants « in vitro ». Agglutination des globulins. — Un certain nombre de substances anticoagulantes, ajoutées au sang *in vitro*, empêchent les globulins de s'altérer ou retardent leurs altérations spontanées. Toutes les substances anticoagulantes ne possèdent pas cette action, et il en est même qui ont des effets altérants. Cette action conservatrice appartient surtout aux substances salines (sulfate de soude et de magnésie, chlorure de sodium et surtout citrate et métaphosphate de soude, oxalates alcalins). Il ne faut pas trop diluer le sang, mais ajouter seulement 1 cc. de la solution saline à 10 ou 20 cc. de sang. La dose à employer varie naturellement avec la nature de l'échantillon de sang. Pour les sangs de cheval, d'âne et d'homme qui coagulent lentement, la solution d'oxalate et de métaphosphate sera employée à 1-2 p. 1.000, la solution de citrate à

(1)

a)	Citrate de soude à 10 p. 100.	10 cc.
	Formol	10 cc.
	Eau salée à 7,5 p. 1.000	80 cc.
b)	Acide osmique à 1 p. 100.	9 cc.
	Citrate de soude à 10 p. 100	1 cc.

5 p. 1.000. Pour le sang du chien qui a une grande tendance à coaguler, on se servira de solutions plus concentrées (10 p. 1.000 de citrate par exemple) (1).

Dans le sang pur, les globulins ont une grande tendance à s'accoler les uns aux autres. Lorsque le sang est mélangé à une solution salée isotonique ou lorsqu'on a ajouté au sang une certaine quantité d'un sel anticoagulant (citrate ou oxalate), cette agglutination ne se produit plus. Toutefois, les globulins de certains animaux, ceux du chien et du mouton par exemple, conservent en milieu salé une grande tendance à s'agglutiner : il faut, pour empêcher le phénomène de se produire, des doses élevées de citrate. Certaines substances comme la peptone, l'ovalbumine, la gélatine augmentent au contraire l'agglutination des globulins du chien. Ceux de l'homme ont une tendance bien moindre à l'agglutination.

Isolement des globulins par sédimentation ou centrifugation. — Lorsqu'on fait sédimenter du sang en vase paraffiné, les globulins, plus légers que les globules rouges, se trouvent réunis dans la couche de plasma superficielle, avec les leucocytes. Le même phénomène se produit lorsque le sang a été rendu incoagulable par addition d'un sel anticoagulant. Cette méthode permet d'isoler les globulins (2). *Le Sourd* et *Pagniez* rendent le sang incoagulable par addition d'oxalate ou de fluorure et centrifugent pendant plusieurs heures. Ils obtiennent une couche superficielle de plasma incoagulable qui contient un grand nombre de globulins et peu de leucocytes et d'hématies. Par des centrifugations successives et en séparant chaque fois la couche superficielle, on arrive à obtenir les globulins presque à l'état de pureté, surtout avec le sang de cheval.

Les globulins ainsi obtenus sont altérés dans leur forme ; ils sont globuleux, granuleux, à contours irréguliers ou étoilés. Cette méthode d'isolement ne convient qu'aux recherches physiologiques ; il n'est du reste, pas absolument sûr que les éléments ainsi isolés aient exactement les mêmes propriétés que *in vivo*.

Sérum antiglobulin. — En injectant au cobaye des globulins de lapin obtenus comme nous venons de l'indiquer, *Le Sourd* et *Pagniez* (3) ont obtenu un sérum de cobaye qui, *in vitro*, détruit ou agglutine les plaquettes. Injecté au lapin, ce sérum fait disparaître les plaquettes et rend le caillot irrétractile. Le sérum antiglobulin agglutine les globulins en suspension dans leur plasma, les transforme *in vitro* en masses granuleuses mais, en général, ne les détruit pas complètement ; il agglutine également les globules rouges. Injecté *in vivo*, il entraîne la disparition prolongée des plaquettes.

Nombre des globulins du sang. Variations numériques. Répartition dans l'organisme. — Les globulins augmentent ou diminuent de nombre dans certains états pathologiques ; ces différences, lorsqu'elles sont importantes, se voient facilement sur les préparations de sang fixées et colorées. On a essayé

(1) Aynaud, *l. c.* Voir aussi Bürker, *Archiv f. d. ges. Physiologie*, CII, 1904.

(2) Le Sourd et Pagniez, *C. R. Ac. des sciences*, 25 juin 1906, et *J. de physiologie et de path. gén.*, juillet 1907 ; — Mosen, *Archiv f. An. u. Phys. phys. Abth.*, 1893 ; — Druebin, *Archiv f. Anatomie und Phys., phys. Abth.*, 18. 3 ; — Chevrel et Roger, *S. de Biologie*, 23 novembre 1907 ; — Pagniez, *Archives des maladies du cœur*, 1909.

(3) Le Sourd et Pagniez, *S. de Biologie*, 21 juillet 1906, 8 décembre 1906, 25 mai 1907, 7 nov. et 30 mai 1908 ; *J. de physiologie*, 1907 et 1911 ; — Sacerdotti, *Archivio per le Scienze mediche*, XXXII, 1908.

de les apprécier d'une manière plus précise par la numération. Celle-ci sera faite en diluant le sang avec du liquide de Marcano légèrement additionné de violet de méthyle. La numération est faite dans les mêmes conditions que celle des leucocytes. L'altérabilité très grande des globulins, dans le sang retiré par la piqûre, rend les résultats d'une pareille numération un peu incertains. Aussi a-t-on proposé divers procédés : piqûre du doigt à travers une goutte de solution fixatrice (osmiquée ou formolée), ponction de la veine et mélange du sang à une solution anticoagulante. Dans ce dernier cas, on obtient d'abord le nombre absolu des globules rouges dans une numération ordinaire ; on établit ensuite le rapport des plaquettes aux hématies dans le mélange oxalaté ou citraté. Cette méthode, due à *Achard et Aynaud* (1) est excellente; mais elle a l'inconvénient de nécessiter une ponction veineuse, ce qui rend impossible les numérations en série. Il est plus simple, suivant la technique recommandée par *Pagniez et Mouzon* (2) de recevoir directement le sang du doigt dans le liquide de Marcano. On fait d'abord une première piqûre et on établit le nombre absolu des hématies, comme d'habitude. On fait ensuite, sur un autre doigt, une seconde piqûre ; on plonge le doigt aussitôt dans un verre à expériences de petites dimensions contenant du liquide de Marcano. On recueille un échantillon du mélange avec la pipette Potain et on fait une numération à l'aide de laquelle on établit le rapport des plaquettes aux globules rouges. Connaissant le nombre absolu de ces derniers par la première numération, il est facile d'en déduire celui des plaquettes.

Chez l'homme adulte, le nombre des globulins est d'environ 2 à 300.000 par mmc. de sang. *Aynaud* donne, pour le rapport des globules rouges aux globulins, chez l'homme, 20 ; chez le rat, 6 ; chez le lapin, 8 ; chez le chien, 13 ; chez le cheval, 32.

Le jeûne absolu et prolongé entraîne généralement une diminution du nombre des globulins. Après les hémorragies, leur nombre se relève plus vite que celui des globules rouges et dépasse souvent la normale. Chez l'homme, à l'état pathologique, on observe des variations très étendues du nombre des globulins (3). D'une manière générale, ils augmentent de nombre dans les maladies aiguës. Dans la pneumonie, on peut observer au début une diminution ; mais le chiffre s'élève rapidement, dépasse fortement la normale, puis redescend à son taux habituel. Il n'existe pas cependant de relation bien nette entre la courbe de la température et la courbe des globulins. Il en est de même dans les fièvres éruptives, dans les suppurations aiguës où ils sont toujours augmentés de nombre. Dans la fièvre typhoïde, ils sont au contraire diminués. Dans les infections chroniques (tuberculose, syphilis), ils sont souvent augmentés. Il en est de même dans le cancer, sauf dans la période de cachexie, où ils sont souvent diminués. Dans les anémies légères, dans la chlorose, leur nombre est normal ou légèrement augmenté. Les

(1) Aynaud, *S. de Biologie*, 18 juin et 9 juillet 1910, fait une numération indirecte, en deux temps. Il obtient d'abord le nombre absolu des globules rouges par mmc., puis il établit le rapport des globulins aux globules rouges dans une dilution à 1 p. 100 faite en aspirant le sang dans la veine avec une seringue chargée de 2 à 3 cc. d'une solution de citrate de soude à 10 p. 100 et en la diluant ensuite à 1 p. 100 avec :

Formol	10 cc.
Citrate de soude	10 gr.
Chlorure de sodium	5 gr.
Eau distillée	q. s. pour 500 cc.

(2) Pagniez et Mouzon, *S. de Biologie*, 25 juin 1921 ; — Mouzon, Thèse Paris 1921.

(3) Hayem, *Du sang*, p. 374 ; — Aynaud, *S. de Biologie*, 18 juin et 9 juillet 1910 ; *Archives des maladies du cœur, des vaisseaux et du sang*, 1911.

résultats sont variables dans la leucémie. Dans la leucémie myéloïde, ils peuvent être très augmentés de nombre. Dans certaines anémies graves, leur nombre peut être, au contraire, diminué d'une manière considérable. Les variations de nombre ne paraissent avoir aucun rapport avec l'intensité de l'anémie.

Les chiffres faibles ont été surtout trouvés dans les syndromes hémorragiques ou purpuriques. Dans le purpura hémorragique, cet abaissement coïncide avec l'irrétractilité du caillot, mais la coïncidence n'est pas absolue. Lorsque le chiffre des plaquettes est faible, on observe en général l'allongement du temps de saignement (1).

Les variations du nombre paraissent dépendre en partie des modifications de la pression sanguine (2). Dans certaines expériences, on observe des variations plus brusques, dont la cause est plus facile à expliquer. Chez le chien, l'injection intraveineuse rapide de 0 gr. 25 de peptone par kilogramme, qui rend le sang incoagulable et abaisse brusquement et momentanément le nombre des leucocytes, produit aussi une diminution considérable des globulins (3). Ils reparaissent 15 à 30 minutes après l'injection. Ils n'ont pas été détruits, car on les retrouve accumulés dans les capillaires du foie. On peut supposer que la peptone, en les agglutinant comme elle le faisait *in vitro* et en modifiant la pression artérielle, a provoqué leur accumulation dans les réseaux capillaires viscéraux (4).

La raréfaction brusque des globulins fait partie des phénomènes qui accompagnent les crises hémoclasiques (5); on l'observe en même temps que la chute du nombre des leucocytes. Elle apparait chez l'animal en état de choc anaphylactique et parfois dans l'anaphylaxie sérique de l'homme.

Les globulins n'existent guère que dans le sang. Les autres liquides de l'organisme : lymphe, chyle, sérosité des cavités, n'en contiennent pas. On n'en trouve pas non plus dans les sérosités pathologiques. Lorsque le sang fait irruption par hémorragie dans les cavités séreuses, ou dans le tissu conjonctif, les globulins y sont entraînés avec lui; mais il est probable qu'ils y sont rapidement détruits, car on ne les trouve pas dans les liquides hémorragiques.

Les globulins sont également très rares dans les organes hémopoiétiques, moelle osseuse, ganglions ; ils paraissent plus constants dans la rate. Pour les colorer sur coupe, on fixera le tissu par les liquides de Dominici (voir ch. I) et on colorera soit par l'éosine-orange-toluidine, soit par la solution de Giemsa étendue d'eau. *Le Sourd* et *Pagniez* (6) ont recommandé l'emploi successif de deux bains colorants : un premier bain (eau distillée, 15 cc. ; Giemsa, V gouttes) dans lequel la coupe reste 12 à 15 heures; un second bain (eau distillée, 15 cc., Giemsa, XV gouttes), dans lequel la coupe reste 4 à 5 heures. Après lavage à l'eau distillée, les coupes sont traitées par des mélanges acétone-xylol de plus en plus riches en xylol. On monte dans le baume ou l'huile de cèdre.

(1) Mouzon, Th. Paris, 1921.

(2) Achard et Aynaud, *S. de Biologie*, 23 mai 1908 et 10 juillet 1909.

(3) Chez les sujets dont la tension artérielle est faible, Le Sourd et Pagniez trouvent les globulins augmentés de nombre (*S. de Biologie*, 27 décembre 1913).

(4) Le phénomène est du même ordre que la leucopénie. Il se produit avec différents colloïdes. Voir ch. VII.

(5) Widal, Abrami et Brissaud, *Presse médicale*, 3 avril 1920 ; — Pratt, *Archiv f. exp. Path. und Pharm.*, XLIX, 1903. Voir aussi ch. VII.

(6) Le Sourd et Pagniez, *S. de Biologie*, 21 octobre 1911, 20 avril 1912 et *Annales de médecine*, 1916; — Bernhardt, *Ziegler's Beiträge*, LV, 1913.

Constitution des globulins. — Les globulins isolés par la centrifugation du sang ne sont détruits ni par l'eau distillée, ni par l'acide acétique, ni par les acides forts. L'ammoniaque et la lessive de soude les dissolvent, au moins partiellement : l'addition de solutions de chlorure de sodium les précipite dans les solutions de soude qui les ont rendues méconnaissables (1). Les solutions de pepsine additionnées d'acide chlorhydrique les transforment en masses granuleuses sans les digérer complètement.

Aynaud a obtenu cependant une digestion complète avec le suc pancréatique de chien activé par du suc intestinal. Les solutions acides étendues, les solutions salées, etc., les transforment en amas granuleux dans lesquels apparaissent des corps très petits et réfringents, très résistants aux réactifs.

Les globulins isolés donnent les réactions des matières albuminoïdes. Leurs cendres contiennent toujours du phosphore et du fer. Traités par l'alcool, l'éther, le chloroforme, ils abandonnent une quantité assez considérable de substances, solubles dans ces liquides et dans lesquelles on a trouvé du phosphore (2).

Les réactions précédentes ont fait supposer que les globulins étaient composés de lipoïdes, de lécithine et de nucléo-protéides. Cette manière de voir tend à rapprocher leur composition chimique de celle des noyaux cellulaires ; mais elle n'a pas encore éclairé leur nature histologique.

Origine des globulins. — L'opinion qui a été le plus souvent soutenue sur l'origine des globulins, c'est qu'ils proviennent de la destruction des globules rouges ou des globules blancs. Dans certaines circonstances, en effet, des bourgeons peuvent se détacher du corps des hématies, ou bien les hématies se résolvent entièrement en grains (voir ch. II). Mais les granulations libres ainsi formées et qui augmentent de nombre au fur et à mesure que les globules rouges s'altèrent et se détruisent paraissent complètement distinctes des plaquettes. On a pensé que les globulins représentaient des portions internes de l'hématie et l'on a cherché à établir une relation entre l'expulsion du noyau du globule rouge et la formation des plaquettes (3) ; mais cette opinion s'appuie seulement sur l'observation de préparations colorées dans lesquelles il n'est pas rare de voir un globulin, légèrement teinté par la couleur nucléaire, accolé à un globule rouge.

Dans certains liquides, dans la lymphe par exemple, les globules rouges peuvent subir une fragmentation en granules. On observe souvent ces amas de granulations, teintes par l'éosine dans les coupes des ganglions lymphatiques. Le fait peut être mis en avant

(1) Lilienfeld, *Arch f. Anatomie und Physiologie. Phys. Abth*, 1891 et 1892; — Löwit, *Ergebnisse der allgemeinen Pathologie*, 1895; — Schwalbe, *Ergebnisse der allgem. Pathologie*, VIII, 1902.

(2) Aynaud, *S. de Biologie*, 21 mars 1914.

(3) Winogradow, *Folia hæmatologica*, XVIII, 1914.

en faveur de l'origine globulaire des plaquettes, mais la démonstration n'est pas faite.

La formation des globulins aux dépens des leucocytes n'est pas démontrée davantage. Les bourgeons protoplasmiques que l'on voit se détacher dans la destruction des leucocytes ou dans la clasmatose physiologique n'ont pas l'aspect des globulins. Les bourgeons leucocytaires formés aux dépens des gros lymphocytes qui ont été observés dans le sang et les organes hémopoiétiques ont été souvent considérés comme l'origine de globulins et cette manière de voir a beaucoup de vraisemblance; mais elle n'est pas démontrée.

Plus récemment, l'idée de l'origine cellulaire des plaquettes a été exprimée sous une forme nouvelle. En étudiant la rate et la moelle osseuse de jeunes mammifères, *Wright* est arrivé à cette conclusion, c'est que les plaquettes sont formées par la fragmentation du cytoplasme des mégacaryocytes (1). Bien que cette manière de voir ait été acceptée de différents côtés (2) et qu'elle soit très plausible, elle ne semble pas encore absolument démontrée (3).

Il est très remarquable que les globulins n'existent pas chez les animaux à globules rouges nucléés (Sauropsidés et Ichtyopsidés) qui ne possèdent pas non plus de mégacaryocytes. On ne les trouve pas davantage dans le sang des jeunes embryons des Mammifères, avant l'apparition des hématies définitives et ensuite, comme ces dernières, ils augmentent de nombre progressivement (voir ch. XI). Ces faits pourraient servir d'argument en faveur de plusieurs des hypothèses que nous avons rappelées plus haut.

Les méthodes nouvelles qui permettent d'isoler les globulins et qui cherchent à provoquer *in vitro* la formation d'anticorps n'ont pas éclairé non plus la nature de ces éléments, et l'on ne sait pas encore s'il s'agit de substances organiques précipitées, de protoplasma vivant ou de débris cellulaires; c'est cette dernière hypothèse qui est la plus vraisemblable (4).

(1) Wright, *J. of Morphology*, XXI, July 1910.

(2) Ogata, *Ziegler's Beiträge*, LII, 1912 ; — Le Sourd et Pagniez, *S. de Biologie*, 15 mars et 19 avril 1913; — Œhlhafen, *Folia hæmatologica*, XVIII, 1914 ; — Downey, *Folia hæmatologica*, XV, 1913. — Ferrata et Negreiros-Rinaldi, *Folia medica*, I, 1915.

(3) Dans certaines expériences, en excitant l'activité de la moelle osseuse, on a obtenu la prolifération des mégacaryocytes et en même temps l'augmentation du nombre des globulins dans le sang. Quant à l'opinion émise par quelques auteurs, qu'il s'agit de véritables éléments cellulaires, elle est très peu vraisemblable. Les mouvements amiboïdes, parfois décrits, n'existent pas et les granulations colorables n'ont qu'une ressemblance morphologique très vague avec un noyau.

(4) Retterer (*S. de Biologie*, 4 décembre 1915) a considéré les globulins comme représentant les mitochondries mises en liberté par la liquéfaction du cytoplasme des cellules de la trame du tissu lymphoïde embryonnaire. L'assimilation des globulins aux

Rôle des globulins. — On sait très peu de choses du rôle physiologique des globulins. Ici encore, nous ne pouvons que résumer les différentes hypothèses et que passer en revue les faits apportés à leur appui.

L'augmentation du nombre des glolulins à la suite des hémorragies avait fait penser autrefois à *Hayem* que ces éléments représentaient de futurs globules rouges; mais les formes intermédiaires, colorées, sur lesquelles il avait appuyé sa théorie des hématoblastes ne sont que de petits globules rouges ou des fragments d'hématies. Les hématies des Mammifères représentent originellement de véritables cellules et elles se forment d'une manière toute différente (voir ch. x).

On a considéré les globulins comme capables de jouer un rôle dans l'immunité. Ils n'ont certainement ni mouvements amiboïdes propres ni pouvoir phagocytaire; mais ils pourraient contenir des substances bactéricides (1). Ils sont capables aussi, en s'accolant aux microbes injectés dans le sang, et en s'agglutinant, de les faire disparaître ou de favoriser leur destruction (2). Quant aux ferments et aux substances hémolytiques provenant des plaquettes, les résultats obtenus sur ce point sont contradictoires et fort douteux.

Les faits qui ont été montrés en faveur du rôle joué par les globulins dans la coagulation sont faciles à constater : une préparation de sang frais d'homme, un peu épaisse, et recouverte d'une lamelle, et bordée à la paraffine, est abandonnée quelque temps jusqu'à ce que la coagulation se soit produite. Enlevant alors la paraffine sur deux bords opposés, on fait passer sous la lamelle un peu d'eau distillée qui dissout les globules rouges, puis une solution

mitochondries a été faite aussi par Portier, sous une autre forme (*les Symbiotes*, Paris, 1918, p. 137). Mais les réactions comparées des globulins et des mitochondries parlent contre cette hypothèse : les mitochondries sont presque exclusivement formées de lipoïdes; les globulins contiennent probablement des lipoïdes, mais sont surtout formés de nucléo-albumines. D'après certaines recherches, les plaquettes consommeraient de l'oxygène (Loeber, *Archiv f. die ges. Physiologie*, CXL, 1911).

(1) Gruber et Futaki, *Münchener med. Woch.*, 1907, et *Deutsche med. Woch.*, 1907; — Schneider, *Archiv f. Hygiene*, LXV, 1908; — Ottolenghi, *Münchener med. Woch.*, 1907. Barreau, *Archiv f. Hygiene*, LXX, 1909; — Aynaud, *S. de Biologie*, 14 janvier 1911.

(2) Delrez et Govaerts, *S. de Biologie*, 26 janvier 1918. A la suite de l'injection intraveineuse de staphylocoques peu virulents chez le lapin, les amas de globulins auxquels sont accolés de nombreux microbes se retrouvent dans les capillaires du foie où les staphylocoques sont phagocytés. Les globulins s'accolent de la même manière aux particules inertes introduites dans la circulation (Govaerts, *S. belge de Biologie*, 31 mai 1919). Le Sourd et Pagniez ont extrait des plaquettes du lapin, par l'eau distillée, un produit qui, en injection intraveineuse chez l'animal, abaisse la pression artérielle (*S. de Biologie*, 26 juillet 1913). L'injection intraveineuse de plaquettes lavées paraît accélérer l'élimination des microbes préalablement introduits dans la circulation (Govaerts, *S. belge de Biologie*, 8 octobre 1921).

faible de fuchsine basique ou une solution iodo-iodurée. On colore ainsi les globulins et le réseau fibrineux. Aux points nodaux du réseau, on aperçoit de petites masses à contour anguleux, qui sont les globulins; de leurs angles partent des filaments de fibrine. *Ranvier* (1) comparait ce phénomène à la précipitation d'une solution sursaturée par l'addition d'un cristal du même sel et il pensait qu'il s'agissait là de petits fragments de fibrine exerçant une influence précipitante sur la fibrine en dissolution dans le sang. En réalité, la précipitation de la fibrine pourrait se produire sur n'importe quel corps étranger; lorsqu'on a protégé les globulins contre une action altérante en se servant des méthodes que nous avons indiquées plus haut, on peut voir des globulins libres dans le réseau fibrineux. Il est donc probable que la précipitation de la fibrine peut se faire sans le contact des globulins (2).

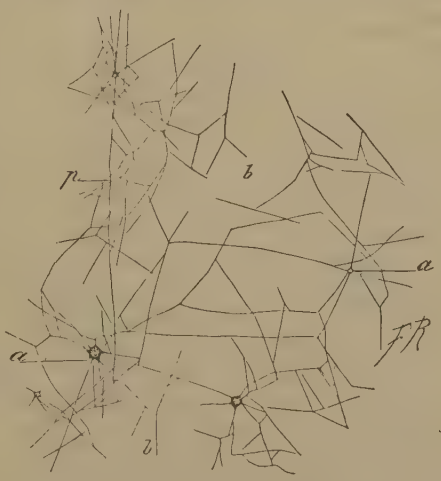


Fig. 259. — Réticulum fibrineux du sang de l'homme.

a, globulins occupant le centre d'un système réticulé ; — *p*, réticulum ; — *b*, *b*, fibres du réticulum. D'après Ranvier.

La coagulation est possible dans des liquides dépourvus de plaquettes (plasma filtré ou centrifugé, lymphe, sérosité sang, de lapin privé de plaquettes par l'injection de sérum antiplaquette). Il est vrai qu'on peut toujours objecter que dans ces liquides, il reste des substances provenant de la destruction des plaquettes.

Le rôle des globulins dans la coagulation a été compris de différentes façons : pour certains, ils participent à la formation de la thrombine ; pour d'autres, ils interviennent surtout par la surface considérable qu'ils offrent à la précipitation de la fibrine.

Si le rôle des globulins dans la coagulation n'est pas encore bien éclairci, nous connaissons leur intervention dans la rétraction du caillot.

(1) *Traité technique*, 2e éd., p. 178.

(2) Aynaud, avec des globulins purs, obtenus par centrifugation, n'est jamais arrivé à provoquer la coagulation du plasma au sulfate de magnésie (solution de fibrinogène des physiologistes). Pour les rapports des plaquettes et de la thrombine, voir plus loin, et Bordet et Delange, *Annales Pasteur*, 1912 et 1913; *Bull. Ac. roy. de Belgique*, 1911 et Bürker, *Archiv f. d. ges. Phys.*, CII, 1904.

Hayem a signalé depuis longtemps le parallélisme qui existe, dans certaines maladies, entre l'augmentation de la fibrine dans le sang et l'augmentation du nombre des globulins, comme on le voit, par exemple, dans la pneumonie. Mais il n'y a pas de relation constante entre l'abondance des globulins et la coagulabilité plus ou moins grande du sang (1).

Hayem a émis l'idée que la présence des globulins était en rapport avec la rétractilité du caillot. Normalement, le caillot, chez l'homme, se produit en 10 à 20 minutes; puis il se rétracte lentement et le sérum exsude. Certains caillots restent mous et ne se rétractent pas. Le fait avait été observé par *Hayem* dans certaines formes d'anémie grave et dans certains purpuras, et il avait noté en même temps la diminution considérable des globulins. Malgré des faits confirmatifs nombreux, la coïncidence n'est cependant pas absolue.

Le Sourd et Pagniez (2) ont montré l'influence des plaquettes sur la rétractilité du caillot formé lorsqu'on provoque la coagulation du plasma salé ou du liquide d'hydrocèle. De plus, par l'injection au cobaye des globulins du lapin, séparés par centrifugation, ils ont obtenu un sérum qui, injecté au lapin, fait disparaître les plaquettes du sang et produit l'irrétractilité du caillot; il empêche aussi *in vitro* la rétraction. Par ces expériences, les rapports des plaquettes avec la rétraction du caillot semblent donc bien avoir été démontrés.

Cellules fusiformes. — Les globulins, tels que nous venons de les décrire, n'existent que dans le sang des Mammifères (3). Mais on observe, chez les Vertébrés à globules rouges nucléés, des cellules particulières qu'on a depuis longtemps distinguées des hématies et des leucocytes et qui, d'après les fonctions qu'on leur attribuait, ont été rapprochées des globulins. Aussi ont-elles souvent reçu le même nom. *Hayem* (4), qui les considérait comme de futurs globules rouges, les appelait hématoblastes nucléés et *Bizzozero*, plaquettes nucléées. Plus tard, *Dekhuyzen* (5), en raison du rôle qu'on leur supposait, les a nommées *thrombocytes*. Le terme de *cellules fusi-*

(1) Aynaud, *in* Gilbert et Weinberg, I, p. 438.

(2) Le Sourd et Pagniez, *C. R. Ac. des Sc.*, 25 juin 1906; *S. de Biologie*, 1906, 1907 et 1908; *J. de Phys. et de Path. gén.*, 1907, 1909, 1911 et 1913.

(3) Les granulations décrites par Ranvier (*Traité technique*, 2e éd., p. 175), dans le sang de la grenouille, par Achard et Aynaud (*S. de Biologie*, 14 décembre 1907) et par Aynaud et Pettit (*S. de Biologie*, 22 février 1913), dans le sang de la poule, paraissent avoir des caractères différents de ceux des globulins.

(4) Hayem, *Archives de Physiologie*, 1879.

(5) Dekhuyzen, *Verhandl. d. An. Gesellschaft, Wien*, 1892, et *An. Anzeiger*, XIX, 1901.

formes sous lequel elles ont été souvent désignées, a l'avantage de ne pas préjuger de leur rôle physiologique (1).

Ces cellules existent dans le sang des Oiseaux, des Reptiles, des Poissons et des Batraciens. C'est chez ces derniers qu'il faut d'abord les étudier, parce qu'elles ont des dimensions plus grandes et un aspect plus caractéristique. Bien qu'elles soient plus altérables, il est pourtant facile d'en obtenir de bonnes préparations en fixant le sang frais par un mélange chromo-osmique.

Dans les préparations fixées et colorées, les cellules fusiformes se reconnaissent facilement au milieu des globules rouges et des leucocytes. Elles sont ovalaires, allongées en forme de navette, aux extrémités en général arrondies. Elles sont probablement aplaties et biconvexes comme les hématies. Leur cytoplasme est peu abondant; il est surtout amassé aux deux pôles. Il paraît homogène et privé d'hémoglobine. A l'un des pôles, ou aux deux pôles, il n'est pas rare d'apercevoir une grosse granulation réfringente. Ces granulations prennent les colorants nucléaires; elles ne représentent pas des centrosomes; elles sont d'origine nucléaire et sont constituées par de la chromatine.

Fig. 260. — Grenouille verte. Sang du cœur. Mélange chromo-osmique. Hématoxyline au fer. Deux cellules fusiformes et trois hématies. 800 diam.

Le noyau est allongé; il occupe une grande partie de la cellule. Sur les préparations bien fixées, il apparaît limité par une membrane; la chromatine est disposée en stries longitudinales parfois doubles et correspondant alors à des plissements. Entre les stries, le suc nucléaire contient de fines granulations chromatiques; on ne voit pas habituellement de nucléoles véritables.

Lorsqu'on a étudié les cellules fusiformes sur des préparations fixées et colorées, on peut les reconnaître dans le sang frais; mais comme ces cellules s'altèrent très facilement, il importe de recueillir le sang avec les plus grandes précautions, pour éviter la coagulation. On constatera, dans ces conditions, que leur protoplasma est homogène et sans hémoglobine. Ces éléments ne paraissent avoir ni mouvements propres ni pouvoir phagocytaire.

(1) Les cellules décrites sous ce nom par Recklinghausen en 1866 (*Archiv f. mikr. Anatomie*, II, p. 137) se rapportent surtout à des hématies altérées et transformées en corps fusiformes et effilés (voir ch. II). Les premières descriptions exactes sont dues à Hayem. Dekhuyzen a distingué des *thromboblastes* et des *thrombocytes*. Les premiers correspondent aux éléments que nous décrivons. Les seconds sont absolument semblables aux cellules nées de la division indirecte d'un érythroblaste (voir ch. XVIII); ce sont probablement de jeunes hématies.

La nature et l'origine des cellules fusiformes n'est pas bien connue. Ces sont des éléments distincts des leucocytes et des hématies; mais on ne sait pas exactement d'où ils viennent. On en trouve, à certaines époques de l'année, dans la moelle osseuse de la grenouille. Dans le sang des Batraciens, la présence de formes intermédiaires permet de penser qu'ils se forment aux dépens de petites cellules lymphoïdes, de lymphocytes. On trouve quelquefois des figures de caryocinèse dans ces cellules; mais elles sont très rares et en général monstrueuses; la division indirecte ne constitue pas le mode de renouvellement habituel de ces cellules qui, comme les hématies, représentent un stade évolué d'une forme moins différenciée.

Fig. 261. — Sang de pigeon. Deux hématies et cinq cellules fusiformes 1.500 diam.

Le protoplasma de ces éléments présente quelquefois des bourgeons capables de se détacher; il s'agit là probablement d'une altération (1). Ces fragments peuvent contenir un corpuscule chromatique paranucléaire. Ce corpuscule chromatique n'est pas un centrosome mais un bourgeon nucléaire dégénéré et qui s'est séparé du noyau. Ce bourgeonnement nucléaire dégénératif explique la formation des *corpuscules paranucléaires* qui existent, non seulement dans les cellules fusiformes, mais aussi dans les hématies des Batraciens et des Reptiles (2).

Rôle des cellules fusiformes. — La destinée et le rôle physiologique des cellules fusiformes sont mal connus. On les a considérées comme de futurs globules rouges. Cette manière de voir a été d'abord exprimée par *Hayem* (3) et elle a été soutenue après lui par beaucoup d'auteurs. A certaines époques, on trouve, dans la moelle osseuse de la grenouille, des formes intermédiaires entre ces cellules et les hématies (4). Mais il est assez difficile d'affirmer que ces formes intermédiaires ne sont pas simplement de jeunes globules rouges provenant de la division d'érythroblastes (5).

Le rôle que jouent les cellules fusiformes dans la coagulation n'est pas mieux éclairé. La coïncidence des altérations de ces éléments dans le sang frais avec la précipitation de la fibrine a été très exactement décrite par *Hayem*. A leur surface

(1) Ce sont ces fragments qui ont été décrits par Eisen et Giglio-Tos sous le nom de *plasmocytes*, et dans lesquels ces auteurs ont voulu voir des éléments particuliers (Giglio-Tos, *Memorie della Reale Acc. della Scienze di Torino*, II, xlvii, 1896).

(2) Jolly, *C. R. de l'Ass. des Anatomistes*, 5e session, Liége, 1903, et *Archives d'An. micr.*, VI, avril 1904.

(3) Hayem, *Archives de Physiologie*, 1879 et *Du Sang*.

(4) Neumann, *Virchows' Archiv*, CXLIII, 1896 et *Arch. f. mikr. An.*, LXXVI, 1911.

(5) Ces formes intermédiaires sont distinctes des hématies qui, par suite de l'altération de la strie bordante, ont pris l'aspect effilé et piriforme.

apparaissent des bourgeons, de courts prolongements ; les cellules se groupent en amas ; le protoplasma devient transparent, le noyau visible ; celui-ci se fragmente et les éléments agglutinés finissent par se confondre en une masse granuleuse. En même temps, le réseau de fibrine est apparu et les cellules altérées forment des centres d'où partent les filaments de fibrine. En prenant comme objet d'étude un triton ou une salamandre et en recueillant la goutte de sang dans l'eau salée à 8 p. 1.000, on retarde la coagulation et les altérations progressives des cellules fusiformes peuvent être suivies avec plus de facilité (1) : la cellule prend une forme globuleuse, le protoplasma forme des bourgeons et le noyau se fragmente. Ces observations peuvent être confirmées sur des préparations fixées et colorées. La lame sur laquelle la couche de sang a été étalée en une couche épaisse est abandonnée quelques instants dans une chambre humide, puis fixée, avant toute dessiccation, par un mélange chromo-osmio-acétique, et enfin colorée par l'hématoxyline au fer, la safranine et l'hématoxyline ou par la combinaison safranine-gentiane-orange. On constate sur ces préparations que de petits bourgeons nucléaires formés en entier de chromatine s'avancent vers les expansions cytoplasmiques. Ces phénomènes paraissent des phénomènes agoniques de la cellule, car ils sont toujours suivis de sa mort et de sa destruction.

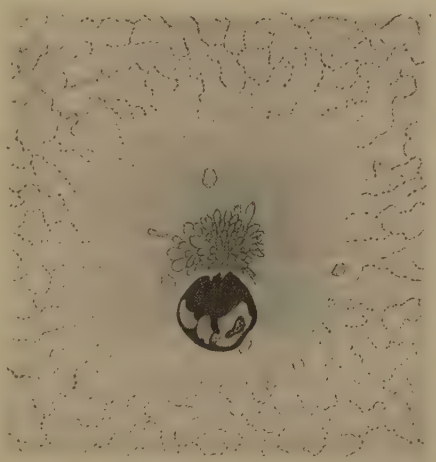


Fig. 262. — Sang de salamandre. Altérations d'une cellule fusiforme pendant la précipitation de la fibrine. Sang fixé et coloré après 30 minutes de séjour en chambre humide. D'après Meves.

On peut aussi, sur ces préparations colorées, suivre le mode d'apparition du réseau de fibrine. Dans les préparations fixées pendant les premières minutes, le véritable réseau de fibrine définitif n'est pas encore formé ; mais on aperçoit une mince membrane finement retractée, qui paraît distincte de la membrane de précipitation due aux réactifs (2). La membrane fibrineuse primordiale emprisonne les hématies et les leucocytes sans adhérer à eux. Elle paraît au contraire adhérer aux cellules fusiformes par l'intermédiaire de filaments radiés qui partent des bourgeons protoplasmiques de la cellule en destruction. Ils forment, autour d'elle, une image qui rappelle les figures radiées de la sphère attractive. De pareilles images apparaissent parfois autour de petites particules qui sont probablement des bourgeons cytoplasmiques devenus libres. Ces filaments radiés sont probablement constitués par de la fibrine. Ils rappellent les figures microscopiques que l'on observe autour des corps étrangers lors de la cristallisation d'une solution sursaturée (3). Ils rappellent aussi les radiations formées par la diffusion d'un

(1) Meves, *Archiv f. mikr. Anatomie*, LXVIII, 1906.
(2) Laker, *Sitz. Ak. Wien*, LXXXVI, 1882 et XC, 1884.
(3) Fischer, *Fixirung, Färbung und Bau des Protoplasmas*, Iéna, 1899.

agent soluble et précipitant (1). Pour *Meves*, l'écran radié produit autour de la cellule fusiforme ou thrombocyte est un phénomène du même ordre : il est dû à la diffusion d'une substance précipitante provenant du cytoplasme de la cellule; la fibrine se précipite suivant les lignes de diffusion de cette substance.

Les cellules fusiformes, comme les globulins des Mammifères, participeraient ainsi à la coagulation du sang en donnant des substances capables de provoquer ou de favoriser la précipitation de la fibrine. Toutefois, ces éléments ne sont pas les seuls agents de cette précipitation, car la membrane fibrineuse primitive décrite par *Laker*, ainsi que le réseau de fibrine définitif paraissent capables de se former en dehors de leur participation.

Le réseau de fibrine définitif apparaît au-dessus de la membrane de Laker; il est constitué par des filaments plus gros, formant des mailles plus lâches. Les cellules fusiformes, pas plus que les hématies ou que les leucocytes, ne paraissent prendre part à la formation de ce réseau.

Ranvier (2) a montré depuis longtemps que dans les préparations de sang frais de grenouille, les globules rouges prennent souvent, au bout d'un certain nombre d'heures, une disposition toute particulière : ils forment des rosaces dans lesquelles leurs grands axes sont orientés autour de centres d'attraction. Le centre de ces rosaces est formé par des cellules fusiformes altérées et par des noyaux de globules rouges. La disposition des hématies en rosace est due à la précipitation de la fibrine, et particulièrement à la contraction des filaments de l'écran radié décrit plus haut.

COAGULATION DU SANG

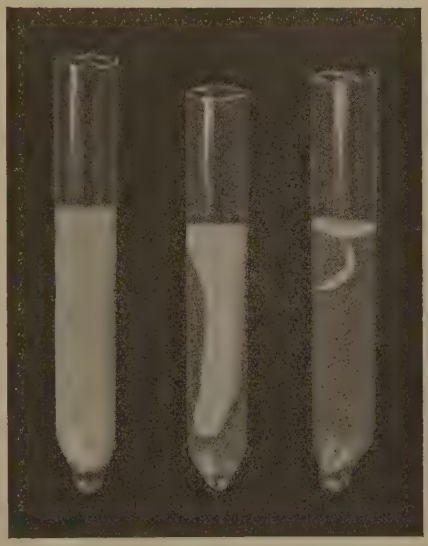
Le sang extrait des vaisseaux et exposé à l'air se prend en gelée. Ce n'est pas la présence de l'air qui cause la coagulation, car le phénomène se produit de la même façon sous une cloche dans laquelle on a fait le vide. Ce qui paraît surtout causer la coagulation, c'est l'action mécanique des surfaces de contact étrangères, comme on le constate par différentes observations : le sang recueilli dans un cristallisoir, dans une soucoupe, se solidifie d'abord rapidement au contact de la paroi; les poudres inertes et insolubles (craie, marbre, charbon, etc.) exercent par leur grande surface de contact, une influence considérable sur la rapidité de la coagulation; la fibrine se dépose rapidement autour de ces corps étrangers. En lubrifiant la surface du verre par un corps gras, huile, graisse, vaseline, ou mieux encore, par de la paraffine que l'on étend en la faisant fondre et qui se solidifie en refroidissant, la coagulation est extrê-

(1) On limite, sur le porte-objet, à l'aide de vaseline ou de paraffine, un petit espace carré dans lequel on dépose une goutte d'une solution coagulable (albumose); on y plonge un minuscule cristal de sublimé et on recouvre rapidement d'une lamelle en évitant les bulles d'air et les courants de liquide. En observant le cristal au microscope, on constate, au bout de 10 à 20 minutes, qu'il est le centre d'une figure radiée due à la diffusion de l'agent précipitant (Meves, *l. c.*)

(2) Ranvier, *S. de Biologie*, 1873, et *Traité technique d'histologie.*

mement ralentie. Elle est, au contraire, très activée par le mélange du sang avec le suc des tissus. Le fait peut être facilement constaté chez les animaux à globules rouges nucléés ; chez la grenouille, la coagulation se produit vite lorsqu'on recueille le sang par ponction du cœur, tandis qu'elle ne se produit que très lentement si le sang est recueilli dans le cœur, après une large section de la pointe.

Manière de recueillir le sang pour étudier la coagulation. — Si l'on veut obtenir une quantité de sang assez considérable, on va le chercher dans une veine superficielle et on le reçoit dans un vase bien propre, flambé ou stérilisé à 180°. S'il s'agit de l'homme ou d'un animal de laboratoire, une simple aiguille de platine, d'un diamètre assez large et dont la pointe présente un biseau court et non effilé, sera le meilleur instrument ; on la stérilise en la passant au rouge ; elle peut être remplacée par une aiguille d'acier, à pointe très aiguisée, mais à biseau court, stérilisée à sec. Chez l'homme, on fait pénétrer l'aiguille directement à travers la peau, dans une veine du pli du coude ; le sang qui s'écoule est reçu directement dans un tube à essai. On opère de la même manière sur la jugulaire du chien, du chat, du lapin, du cobaye, après l'avoir mise à nu. On peut se servir d'une seringue en verre armée d'une canule d'acier, stérilisée à sec ou bouillie dans l'eau salée et pratiquer la ponction du cœur. On distribue le sang dans des tubes à essai, dont la dimension varie suivant la quantité de sang sur laquelle porte l'expérience et qui ont été nettoyés et stérilisés ; on les recouvre d'un capuchon de caoutchouc. Dans les cas où le sang est recueilli, non pour observer la coagulation, mais pour obtenir du sérum dans des conditions de pureté absolue, on utilisera des dispositifs spéciaux. Quand il s'agit de recueillir, chez des animaux relativement petits (chien, lapin) de grandes quantités de sang, pour avoir le plasma ou le sérum, on place la canule sur la carotide et on sacrifie l'animal. *L. Camus* a indiqué un excellent procédé pour obtenir rapidement le sérum (1). Le sang est recueilli asep-



1 2 3

Fig. 263. — Influence des globulins sur la rétraction du caillot. Trois tubes contenant même quantité de plasma oxalaté dont on a provoqué la coagulation par addition de chlorure de calcium. En 1, le liquide était privé de plaquettes, le caillot est irrétractile. En 2 et 3, le caillot s'est rétracté proportionnellement à la quantité de plaquettes ajoutées avant la recalcification. D'après Le Sourd et Pagniez.

(1) L. Camus, *S. de Biologie*, 28 avril 1900.

tiquement dans un tube de centrifugeur, centrifugé aussitôt avant la formation du caillot; le sérum est bientôt rassemblé dans la partie supérieure du tube tandis que le caillot se forme dans le fond. Ce procédé est avantageux dans les cas où le caillot se rétracte mal et où les globules, altérables, laissent diffuser l'hémoglobine.

Quand on n'a besoin que de quantités modérées de sang, on peut introduire directement dans la veine jugulaire bien dénudée du lapin, du cobaye, du rat, l'extrémité effilée et recourbée d'une pipette stérilisée. Celle-ci a été préparée avec un étranglement de sorte qu'après la prise on peut fermer à la flamme les deux extrémités de l'ampoule.

Chez la grenouille, on met le cœur à nu, on sectionne la pointe du cœur et on recueille directement le sang, dans la cavité ventriculaire, avec une pipette étranglée; on ferme ensuite à la flamme les deux extrémités du renflement.

Chez les Oiseaux, on puise le sang directement avec la pointe de la pipette dans la veine axillaire ou basilique mise à nu. Le choix de l'espèce animale a une grande importance, car le sang des différentes espèces a une tendance très inégale à se coaguler. Le sang des animaux à globules rouges nucléés coagule très lentement si le sang a été recueilli à l'abri du suc des tissus. Parmi les mammifères, il y a de grandes différences : le sang du chien et celui du lapin coagulent très vite ; le sang du cheval et de l'âne coagule très lentement. Aussi a-t-on souvent utilisé le cheval pour les études sur le plasma, le sérum et la coagulation, non seulement à cause de la quantité de sang considérable qu'il peut fournir régulièrement par simple saignée de la jugulaire, mais à cause de la lenteur de la coagulation qui permet d'obtenir un plasma pur.

On peut enfin, chez l'homme, observer la coagulation, en recueillant une minime quantité du sang par piqûre du doigt. On réalisera les meilleures conditions de la prise du sang en piquant le dos du doigt, sans lien, le doigt étant bien desséché, sans œdème, et en faisant avec une lancette une piqûre franche, assez profonde pour obtenir une grosse goutte de sang, sortant spontanément, sans pression. On a préparé une pipette stérilisée, dont l'effilure est longue et pas trop mince. On aspire la goutte, qui forme dans l'effilure une petite colonne longue de 2 centimètres environ ; on ferme au dessus et au dessous, à la petite flamme d'un brûleur. Cette méthode permet d'observer la formation et la rétraction du caillot et elle permet aussi d'obtenir une quantité de sérum suffisant pour quelques observations. Dans les cas où on veut observer les phénomènes histologiques de la coagulation du sang, on reçoit la goutte entre lame et lamelle et on soude à la paraffine.

Phénomènes apparents de la coagulation du sang. — Quelle que soit la manière dont le sang a été recueilli, la coagulation comprend deux phases : dans une première phase, qui se produit assez rapidement, le sang se prend en masse ; il forme une gelée qui contient à la fois les globules et la fibrine. Dans une deuxième phase, cette masse se rétracte et le sérum exsude : c'est un liquide transparent, très légèrement coloré en jaune ambré, paraissant même incolore lorsqu'il est vu sous une faible épaisseur ; il représente le plasma privé de la fibrine.

L'aspect du caillot varie un peu suivant la forme du vase où a été

recueilli le sang. Dans un verre à expérience, la coagulation commence contre la paroi du verre, elle gagne ensuite le centre. Lorsque le caillot se rétracte, la surface du caillot se déprime au centre qui forme un godet contenant du sérum; au fond du verre, l'extrémité conique du caillot s'affile et le sérum apparaît tout autour. Dans un tube à essai, le caillot adhère de même au verre, et dans sa contraction il se détache peu à peu et s'effile. Dans la pipette, surtout dans la colonne de sang isolée dans l'effilure, le caillot rétracté est naturellement filiforme ; la contraction inégale de ses fibres, dans le sens vertical, lui donne un aspect spiralé.

La couleur du caillot varie avec l'origine du sang; elle est généralement d'un rouge brun. Cette coloration n'est pas toujours uniforme : lorsque le sang s'est coagulé lentement, comme il arrive, par exemple, avec le sang du cheval, la sédimentation des globules commence à se faire avant la précipitation de la fibrine. Les leucocytes, moins lourds que les hématies, tombent plus lentement, de sorte qu'ils se trouvent nombreux dans les parties superficielles du caillot qui forment une couche blanchâtre, la couenne. Si la sédimentation des globules rouges a été très en avance sur la coagulation, le caillot est formé d'une partie supérieure, blanchâtre, où le plasma coagulé ne contient que de la fibrine, des leucocytes et des plaquettes, et d'une partie inférieure, rouge, où la fibrine emprisonne tous les globules rouges. Ces faits peuvent se voir aussi chez l'homme, où l'importance de la couenne, c'est-à-dire de la portion superficielle blanchâtre du caillot, n'est pas due seulement à l'abondance de la fibrine et du grand nombre de leucocytes, mais aussi à la lenteur de la coagulation (1).

La phase de rétraction du caillot peut manquer; on obtient seulement un caillot mou, ayant la consistance d'une gelée et le sérum n'exsude pas. Le phénomène s'observe surtout chez les Vertebrés à globules rouges nucléés, chez les Oiseaux, dont le sang coagule lentement. On peut l'observer aussi chez l'homme, dans certains états pathologiques, comme l'a montré *Hayem* dans l'anémie pernicieuse, dans certaines formes de purpura, dans les états cachectiques avec anémie extrême, la variole hémorragique, etc.

Enfin le caillot peut se redissoudre alors que la coagulation s'est effectuée normalement. Les caillots obtenus avec le sang des Vertébrés inférieurs présentent souvent ce phénomène. Cette redissolution est plus ou moins tardive et complète. On peut l'observer aussi

(1) Hayem, *Du Sang*, p. 210; — O. Claude, *Thèse*, Paris, 1908.

chez les Mammifères et chez l'homme à l'état pathologique ; elle a été signalée dans l'hémoglobinurie, la cachexie palustre avec purpura, l'ictère grave.

Circonstances qui influencent la rapidité de la coagulation. — Des facteurs très nombreux influencent la rapidité de la coagulation. La manière de recueillir le sang a beaucoup d'importance ; on ne peut naturellement comparer que des résultats obtenus avec la même méthode. Celle qui donne les résultats les plus constants est la prise directe du sang dans la veine et l'observation de la coagulation dans de petits tubes à essai. On note : 1° le début de la coagulation ; 2° la prise en gelée de la masse, assez complète pour permettre le renversement du tube ; 3° l'apparition du sérum exsudé. Ces points de repère sont naturellement assez vagues ; aussi ne peut-on espérer obtenir, sur la vitesse de la coagulation, des déterminations d'une très grande précision (1).

Chez le lapin et chez le chien, la coagulation est rapide ; chez le cheval et chez l'âne, elle est infiniment plus lente ; le sang de l'homme occupe une situation intermédiaire : à la température ambiante, la coagulation commence de 2 à 5 minutes après la sortie des vaisseaux et la rétraction est complète en 12 à 24 heures ; les différences individuelles sont donc très étendues (2). En général, la prise en gelée est effectuée en 5 à 10 minutes et la rétraction est complète en 12 à 18 heures.

Chez les Vertébrés à globules rouges nucléés, la coagulation est très lente et le sang sédimente, de sorte que par la centrifugation on peut obtenir un plasma pur qui, par exemple chez les Oiseaux, peut se maintenir longtemps liquide (3). Le sang des embryons de mammifères coagule aussi assez lentement.

Dans les vaisseaux, le sang ne cogule que très lentement (4). La température extérieure a une influence marquée sur la rapidité de la coagulation. Le froid la retarde et la chaleur l'accélère. Le sang d'un homme dont la coagulation sera effectuée en 10 minutes à 18° mettra près d'une heure à se prendre en gelée à une température de 5°. La saignée, les hémorragies augmentent la rapidité de la coagulation.

Substances qui augmentent ou diminuent la coagulabilité du sang. — Un certain nombre de substances ont une activité marquée sur la coagulabilité du sang : les solutions concentrées des sels neutres de potassium et de sodium ralentissent ou suspendent la coagulation. Si on mélange le sang à volume égal, avec une solution concentrée de sulfate de soude ou une solution de chlorure de sodium à 10 p. 100, le sang reste fluide ; les globules se déposent, et le plasma clair qui surnage, dilué de 3 à 4 fois son volume d'eau distillée, se coagule, soit spontanément, soit très facilement sous l'influence des agents coagulants. Les sels de potassium ont la même action ; il en est de même du sulfate de magnésie.

(1) Voir Morawitz, in *Handbuch der bioch. Arbeitsmethoden de Abderhalden.*

(2) Hayem, *Leçons sur les modifications du sang*, etc., Paris, 1882, p. 348, et *Du Sang, l. c.*

(3) Delezenne, *S. de Biologie*, 22 mai 1897 et *Archives de physiologie*, 1897.

(4) Un segment de veine jugulaire de cheval, isolé entre deux ligatures, suspendu verticalement, à une température basse, montre une sédimentation complète du sang, avant toute coagulation, et la formation d'une couche superficielle contenant les leucocytes et les globulins (Glénard, Th. Paris, 1875).

Les sels de calcium, employés à forte dose, empêchent la coagulation *in vitro*. L'action anticoagulante du chlorure de calcium varie suivant l'échantillon du sang ; à 2 p. 100, le chlorure de calcium arrête toute coagulation. A dose faible, *in vitro*, les sels de calcium accélèrent au contraire la coagulation.

Les oxalates et les fluorures alcalins, à dose suffisante (1,5 p. 1000 d'oxalate de soude ; 3 p. 1.000 de fluorure de sodium), mélangés au sang *in vitro*, empêchent la coagulation, grâce à leur propriété de précipiter les sels de chaux, nécessaires à la coagulation. Les citrates alcalins (4 p. 1000 de citrate de soude) sont également anticoagulants, et ne précipitent pourtant pas les sels de calcium. On a attribué leur activité à leur propriété de diminuer l'ionisation des sels de chaux dans le plasma, ceux-ci n'ayant d'action que dissociés à l'état d'ions (1).

Le protoplasma cellulaire contient des substances dont l'action est anticoagulante. Aussi a-t-on pu préparer de nombreux extraits d'organes qui ont une pareille action. Parmi ces extraits, l'extrait aqueux de têtes de sangsues préalablement durcies par l'alcool est un de ceux qui ont l'action la plus énergique. Le phénomène peut être observé *in vitro* ou *in vivo*, en injectant l'extrait dans les veines d'un lapin.

D'autres extraits de tissus frais favorisent, au contraire, la coagulation, peut-être à cause de la lécithine qu'ils contiennent. Il en est de même pour certains produits de sécrétion (lait, mucus), pour la gélatine, qui, *in vitro* et *in vivo*, augmente la coagulabilité du sang. Le fait peut varier suivant la dose : la peptone, *in vitro*, favorise, retarde ou empêche la coagulation suivant la concentration. Il en est de même *in vitro*, pour le venin des serpents. L'action anticoagulante de la peptone *in vivo* est une de celles qui a été le plus étudiée : en poussant rapidement vers le cœur, dans la veine fémorale du chien, une solution de peptone Witte à raison de environ 0 gr. 30 par kilogramme dissoute dans 10 fois son poids d'eau salée à 7 p. 1.000, le sang est rendu incoagulable. *In vitro*, l'action anticoagulante de la peptone ne s'observe qu'avec des doses très fortes.

Phénomènes histologiques de la coagulation du sang. — Le phénomène de la coagulation du sang peut être analysé au microscope de différentes façons : en étudiant la structure du caillot ou celle du réseau de fibrine, à l'aide des procédés de l'analyse histologique, ou en cherchant à observer directement au microscope, le mode de précipitation de la fibrine.

Recueillons dans la partie effilée d'une pipette une petite quantité de sang d'homme, fermons à la lampe et laissons le caillot se former et se rétracter, phénomène qui sera en général complet au bout de 24 heures. Le mince caillot filiforme est alors dissocié sur lame, avec des aiguilles, dans son propre sérum. On examine au microscope ; on aperçoit nageant dans un liquide incolore, de nombreux globules rouges, qui ne paraissent pas modifiés, ou qui présentent seulement les déformations que nous avons observées dans le sang frais conservé depuis peu de temps : transformation épineuse, glo-

(1) Arthus, *la Coagulation du sang*. Collection Scientia, Paris.

bules crénelés et montrant sur leurs faces de petites saillies; mais leur couleur est intacte, les formes sphériques sont rares, ils ne sont ni hémolysés ni détruits. Parmi eux on trouve des leucocytes qui paraissent absolument intacts. Si la préparation a été convenablement faite, on peut observer, déjà à la température du laboratoire, des mouvements pseudopodiques de quelques-uns d'entre eux. Si on élève la température jusqu'à 37°, en se servant d'une platine chauffante, un grand nombre de leucocytes montreront des mouvements amiboïdes manifestes.

En plus des hématies et des globules rouges, on observe de nombreux filaments de fibrine. Leur réfringence est faible, de sorte que pour les bien voir, il faut faire passer sous la lamelle une goutte d'une solution iodo-iodurée. En dissociant le caillot dans un peu d'eau distillée ou dans une solution aqueuse faible de violet de méthyle ou dans le picrocarmin de Ranvier, les hématies disparaissent et le réseau fibrineux est bien mis en évidence. Les filaments de fibrine, insolubles dans l'eau distillée, se dissolvent dans les solutions de chlorure de sodium très concentrées (10 à 20 p. 100) ou par l'acide acétique dilué.

Le caillot est donc composé des globules du sang, du plasma et de la fibrine; le nouveau plasma, dont la fibrine s'est séparée, c'est le *sérum*. Les fibrilles fibrineuses ont une propriété remarquable : elles ont une tendance à se raccourcir, à se contracter graduellement, de sorte que si on examine des fragments de caillot à des intervalles différents, le réseau fibrineux apparaît de plus en plus serré. C'est cette contraction de la fibrine qui cause la contraction de l'ensemble du caillot; celui-ci, exprimé comme une éponge, laisse transsuder le sérum.

En dissociant de petits fragments de caillot dans la solution iodo-iodurée, le réseau fibrineux apparaît avec une grande netteté; on peut aussi l'étudier en place, en pratiquant des coupes dans le caillot.

Étude du caillot. Méthodes de coloration de la fibrine. — Si le caillot a été fixé dans un liquide qui conserve très bien les globules rouges, solutions de bichromates ou de formol, ceux-ci gênent l'observation du réseau de fibrine. Il peut donc être avantageux de fixer le caillot dans un liquide qui, comme l'alcool faible, provoque une hémolyse plus ou moins complète des globules rouges et conserve la fibrine. On peut alors faire l'inclusion à la paraffine. Dans le cas où les globules rouges ont été bien conservés, l'inclusion à la celloïdine donne des résultats bien préférables.

L'alcool fort, les fixateurs à base de bichromate de sublimé et de formol sans acide acétique, conservent bien le réseau de fibrine. Il est très bien coloré par le

picrocarmin de Ranvier après l'alcool ou après les bichromates. Sur les coupes après inclusion, le réseau de fibrine est coloré en rose par l'éosine ; dans la double coloration hématéine-éosine, il y a intérêt à faire agir lentement l'éosine et à employer une solution aqueuse étendue. Mais la méthode de coloration la plus élective est celle de *Weigert* (1), qu'on emploiera de préférence après fixation par l'acool à 90°. On colore à fond pendant 5 à 15 minutes dans une solution aqueuse concentrée de violet de gentiane dans l'eau d'aniline ; on lave à l'eau ; on porte 2 ou 3 minutes dans la solution iodo-iodurée ; on différencie dans

Huile d'aniline	2 p.
Xylol	1 p.

xylol-baume. La fibrine est électivement colorée en bleu ; les noyaux peuvent être colorés ensuite par le carmin lithiné.

La fibrine peut être colorée aussi par la méthode de Weigert employée pour la coloration de la gaine de myéline (2) et par l'hématoxyline au fer après l'action des bichromates. Les méthodes de Mallory pourront être aussi utilisées.

Les méthodes de coloration électives de la fibrine pourront être employées avec avantage pour l'étude du réseau fibrineux des exsudats ; le poumon atteint de pneumonie est un objet particulièrement favorable. La double coloration à l'hématoxyline et à l'éosine convient très bien aux coupes de caillot. Les coupes longitudinales d'un caillot qui s'est formé dans la position verticale montrent que dans les parties inférieures, le caillot est particulièrement riche en globules rouges et que le réseau fibrineux est très lâche. Il est plus abondant dans les parties supérieures où les leucocytes et les globulins sont beaucoup plus nombreux. Les leucocytes y paraissent intacts et leur noyau se colore bien.

Observation du réseau fibrineux formé dans une préparation de sang frais. — Les méthodes précédentes ne donnent pas des renseignements suffisants sur le mode d'apparition de la fibrine et sur les relations des fibrilles du réseau avec les éléments figurés du sang. Il faut étudier le réseau de fibrine dans une préparation de sang frais. On observe les portions de plasma intermédiaires aux piles de globules rouges. On voit apparaître les filaments de fibrine, qui sont d'abord rares et extrêmement fins et qui peu à peu forment un réseau plus abondant, à mailles plus serrées et à filaments plus gros. Dans ce réseau, il n'est pas difficile de voir cheminer des leucocytes, qui, pas plus chez les Mammifères que chez les Vertébrés inférieurs, ne présentent de relations avec ce réseau ; ils en sont parfaitement indépendants et la précipitation de la fibrine ne semble avoir en rien altéré la vitalité de ces éléments. Au contraire, les globulins paraissent former des centres de précipitation et les filaments de fibrine s'insèrent sur eux. Cette relation n'est toutefois pas absolue, d'après les observations de *Aynaud* qui, dans l'étude de la coagulation du plasma paraffiné, a vu des globulins libres.

Le réseau fibrineux qui s'est formé dans une préparation de sang frais peut être mis en évidence par des colorations. Une préparation de sang frais un peu épaisse est abandonnée pendant quelques heures jusqu'à ce que la fibrine se soit

(1) Weigert, *Forschritte der Medicin*, 1887, et *Fibrinfärbung in Enzyklopädie d. mikr. Technick d'Ehrlich* ; — Sabouraud, *Annales Pasteur*, 1892.

(2) Kockel, *Centralblatt f. allgem. Pathologie*, X, 1899.

précipitée. Enlevant alors la paraffine, on fait passer sous la lamelle un peu d'eau distillée et on plonge le tout dans une soucoupe pleine d'eau ; la lamelle se soulève ; le réseau de fibrine resté adhérent et privé de ses globules rouges, peut être alors fixé et coloré sur la lame par une des méthodes que nous avons indiquées. L'abondance de ce réseau est augmentée dans certaines maladies inflammatoires, en particulier dans la pneumonie. Sur ces préparations, on constate les relations des globulins et du réseau de fibrine, relations qui n'ont rien d'absolu, puisque dans la coagulation du plasma paraffiné, on peut trouver des globulins indépendants.

Dans les caillots des animaux à globules rouges nucléés, le réseau de fibrine est moins abondant et plus difficile à observer que chez les Mammifères ; mais il peut être mis aussi en évidence par des méthodes analogues qui montrent les relations des filaments de fibrine et des cellules fusiformes. Si on recueille sans précautions, avec une pipette piquée dans le cœur, le sang d'un triton, de telle façon qu'un peu de suc des tissus soit mélangé au sang, celui-ci se coagulera presque aussitôt. Si on suit, dans une chambre humide, l'exsudation du sérum, on pourra voir les leucocytes, d'abord emprisonnés dans le caillot, en sortir grâce à leurs mouvements propres, attirés par l'oxygène contenu dans la rigole circulaire ; de telle sorte qu'on en trouve, au bout de quelques heures, qui sont libres, vivants et mobiles dans le sérum.

Caillots des thromboses vasculaires. — Les phénomènes histologiques de la coagulation du sang ont été aussi étudiés lorsque le sang se coagule dans les vaisseaux, dans les thromboses spontanées ou expérimentales. Celles-ci peuvent être favorisées par le ralentissement du cours du sang qui produit une accumulation des plaquettes dans les territoires où la circulation est ralentie; mais la thrombose est due surtout aux altérations de la paroi vasculaire et aux modifications de la constitution du sang.

Dans la thrombose veineuse de la phlébite, la lésion de la paroi est primitive (*Cruveilhier*) et elle est le plus souvent due aux microbes et à leurs toxines (1). Expérimentalement, on a produit la thrombose par l'introduction dans le sang d'un grand nombre de substances étrangères (sang hétérogène, extraits d'organes, venins, etc.) qui agissent d'abord sur le sang et dont beaucoup produisent d'abord une destruction ou une agglutination plus ou moins considérable des hématies (2).

La structure de ces thrombus n'est pas toujours la même. Le caillot qui se forme dans la phlébite infectieuse des membres inférieurs présente une portion supérieure, dirigée vers le cœur (tête du caillot) qui est libre (caillot prolongé) et une extrémité inférieure, plus ou moins adhérente à la veine. Sur les coupes, le caillot apparaît souvent formé de couches concentriques, dues aux coagulations successives qui se sont formées après le retrait du premier caillot (3). Dans d'autres cas, le caillot apparaît sur la coupe, strié par des travées irrégulières grisâtres où les leucocytes et les globulins sont plus nombreux.

(1) Vaquez, De la phlébite, in *Clinique médicale de la Charité de Potain*, Paris, 1894, et IIIe Congrès français de médecine, Nancy, 1896.

(2) Ribbert, *Deutsche med. Woch.*, 1914.

(3 Cornil et Ranvier, *Manuel d'Histologie pathologique*, 2e éd., I, 1884, p. 625. Les caillots adhérents des artères, de même que les caillots adhérents des veines, sont la conséquence immédiate de l'inflammation de la membrane interne de ces vaisseaux (Cruveilhier, *Anatomie pathologique*, II, 1852, p. 294).

Au niveau des points où le caillot est adhérent et où se trouvent les lésions de la phlébite, les globulins et les leucocytes sont nombreux ; ils sont englobés dans la fibrine, et forment un thrombus blanc. Dans ses parties centrales, le caillot présente souvent des foyers de ramollissement et de nécrose qui prédisposent à la rupture et à l'embolie. Mais ces phénomènes sont rarement capables de faire disparaître le caillot, qui s'organise et se transforme presque toujours en une cicatrice fibreuse. Le mécanisme de cette transformation a été étudié expérimentalement par des plaies et des ligatures des veines. Les cellules de l'endothélium du vaisseau se gonflent ; elles se mobilisent, s'insinuent entre les précipités de fibrine, s'accolent aux filaments de fibrine, se multiplient, s'anastomosent et morcellent ainsi le thrombus. Ce nouveau tissu est pénétré secondairement par des bourgeons vasculaires partis de la paroi interne du vaisseau et qui transforment la cicatrice en un tissu caverneux où la circulation se rétablit partiellement (1).

Dans ces phénomènes, la fibrine joue le rôle de soutien et de nourriture pour les nouveaux éléments venus de la paroi de la veine. On observe des phénomènes analogues dans l'évolution de l'artérite oblitérante et dans la formation des cicatrices qui succèdent aux plaies des artères et des veines. La fibrine joue le même rôle dans la formation des différentes cicatrices (voir ch. VII, fibres synaptiques).

Les thrombus qui se forment dans les petits vaisseaux à la suite de l'injection expérimentale de substances étrangères n'ont pas toujours l'aspect que nous venons de décrire; ils sont souvent homogènes, hyalins, riches en plaquettes. A ces thrombus appartiennent aussi ceux qui succèdent à l'injection de poisons du sang et où l'on trouve des produits de destruction des globules rouges. Des thrombus blancs à plaquettes ont été souvent produits par des expériences dans lesquelles le vaisseau était lésé directement ; l'accumulation des plaquettes précède la précipitation de la fibrine (2).

Sang du cadavre. — Dans les vaisseaux du cadavre, le sang coagule très lentement. En dehors des caillots partiellement adhérents des thromboses veineuses et artérielles et des anévrysmes, on ne trouve en général, aux autopsies humaines, de caillots bien formés que dans le cœur. Ces caillots peuvent se présenter sous divers aspects : le plus communément, les oreillettes sont remplies de caillots complètement noirs et non adhérents. Ces caillots n'ont en général aucune signification particulière et sont formés après la mort. Il en est de même des gros caillots fibrineux que l'on trouve dans le ventricule droit : leur couleur mi-partie rouge, mi-partie blanche est due à la sédimentation, qui s'est effectuée après la mort par suite de la lenteur de la coagulation. Ces caillots fibrineux peuvent se rencontrer aussi dans le ventricule gauche, mais plus rarement, parce que ses parois plus épaisses chassent plus facilement le sang que contient sa cavité, soit par les dernières contractions du cœur, soit par la rigidité cadavérique après la mort.

(1) Cornil et Ranvier, *Histologie pathologique*, 2e éd. ; — R. Marie, *Système vasculaire*, in Cornil et Ranvier, *Histologie pathologique*, 3e éd., III, p. 853 ; — Cornil, *J. de l'Anatomie*, 1897.

(2) Eberth et Schimmelbusch, *Virchow's Archiv*, CIII, 1886 ; — Zurhelle, *Ziegler's Beiträge*, XLVII, 1910 ; — Derewenko, *Ziegler's Beiträge*, XLVIII, 1910 ; — Klemensiewicz *Ziegler's Beiträge*, LXIII, 1916 ; *Festschrift f. Marchand* ; — Aschoff, *Path. Anatomie*, 1919 ; — Kusama, *Ziegler's Beiträge*, LV, 1913.

Ces différents caillots n'ont aucune signification pathologique. Il en est autrement des caillots adhérents. Ceux-ci peuvent se présenter sous des aspects divers : parfois, ils forment des concrétions fibrineuses jaunes, élastiques ou gélatineuses qui, sans adhérer à l'endocarde, sont enchevêtrés dans les saillies musculaires de la paroi cardiaque ; ils ne sont pas rares dans les auricules, surtout dans l'auricule droite ; ils sont vraisemblablement formés pendant l'agonie. Dans les cas de mort par asphyxie lente, on trouve ordinairement les veines caves, leurs branches d'origine et les cavités droites du cœur remplies de sang ; ce sang est coagulé dans le cœur et le caillot du ventricule droit se prolonge plus ou moins loin dans l'artère pulmonaire. Ces caillots peuvent être considérés comme des caillots agoniques (1). Dans l'endocardite aiguë, on trouve, adhérents aux valvules, de petits caillots rouges-bruns, friables, de forme irrégulière et souvent lamelleux ; ces petits caillots ont été formés pendant la vie ; on les trouve ordinairement au niveau de la mitrale, mais on peut les observer au niveau de toute portion de l'endocarde altéré ; ils ont même signification que ceux de la phlébite, de l'artérite, des anévrysmes, des lésions athéromateuses artérielles. Dans les autopsies de leucémie, et particulièrement dans les autopsies de myélocytémie, les caillots cadavériques non adhérents que l'on trouve dans les cavités droites du cœur ont un aspect tout particulier : ils sont violacés, friables et comme purulents. Cet aspect est dû au grand nombre de leucocytes que contient le sang ; il s'agit presque toujours de caillots formés après la mort.

Dans les veines du cadavre, on trouve communément du sang encore liquide ; ce sang, extrait des vaisseaux, est encore capable de coaguler, mais cette coagulation est lente et peu énergique. *Schmidt* avait attribué le fait à la mort des leucocytes. Il est dû probablement à la mort des diverses cellules capables de livrer au sang les constituants de la thrombine ; mais la question n'est pas résolue.

Mécanisme de la coagulation. — L'étude des phénomènes chimiques de la coagulation du sang ne rentre pas dans le cadre de cet ouvrage. Nous nous contenterons d'exposer brièvement les faits les mieux connus et les hypothèses qui ont été données pour les expliquer (2).

La coagulation est caractérisée essentiellement par la précipitation de la fibrine. Cette fibrine ne préexiste pas dans le plasma, mais ses constituants s'y trouvent. Certains plasmas, non spontanément coagulables (liquide d'hydrocèle, liquide d'ascite, sang de cheval auquel on a ajouté du sulfate de magnésie etc.) sont susceptibles de se coaguler par addition de sérum sanguin. Il y a donc dans ces liquides une substance fibrinogène et dans le sérum une substance capable de transformes le fibrinogène en fibrine ; c'est le *fibrin-ferment* ou *thrombine*. La coagulation est considérée ainsi, surtout sous l'influence des travaux de *Buchanan*, de *Schmidt* et de *Hammarsten* comme une action diastasique qui transforme en fibrine préci-

(1) Dans les cas de mort rapide par asphyxie mécanique, les caillots formés dans le cœur sont naturellement beaucoup moins importants. Cf. Blanc, Th. Montpellier, 1901.

(2) Consulter surtout : Morawitz, *Ergebnisse der Physiologie*, 1905 ; — Fredericq, *Coagulation* in *Dictionnaire de Physiologie*, de Ch. Richet ; — Arthus, *la Coagulation du sang*, Paris et *Précis de Physiologie* ; — Schmidt, *Zur Blutlehre*, Leipzig, 1892 ; *Weitere Beiträge zur Blutlehre*, Wiesbaden, 1895 ; — Nolf, *Archives intern. de Physiologie*, 1906, 1908 et 1910, et article *Coagulation* in *Traité du Sang*, de Gilbert et Weinberg ; — Bordet et Gengou, *Annales Pasteur*, 1901 et 1904 ; — Duclaux, *Traité de microbiologie*, t. II ; — Bordet et Delange, *Annales Pasteur*, 1912 et 1913 ; — Morat et Doyon, *Physiologie* ; — Gley, *Physiologie* ; — Lambling, *Biochimie* ; — Gratia, *J. de Phys.*, 1917-18 ; — Bordet, *Annales Pasteur*, 1920.

pitable un corps albuminoïde en dissolution dans le sang, le *fibrinogène*. La substance précipitante du sérum provient des éléments figurés et probablement des globules blancs, car c'est avec la couche de globules blancs superficielle du sang de cheval sédimenté ou avec les globules du pus qu'on obtient la coagulation la plus forte du liquide d'hydrocèle, non spontanément coagulable.

En 1890, *Arthus* et *Pagès* (1) montrent l'action favorisante des sels de chaux sur la coagulation. Si l'oxalate de potasse rend le sang incoagulable, c'est qu'il lui enlève les sels de chaux en les précipitant. Partant du fait que les cendres de la fibrine contiennent toujours du calcium, *Arthus et Pagès* furent conduits à admettre que la fibrine était une combinaison calcique. Les expériences de *Pekelharing* (2) l'amenèrent à conclure que les sels de chaux n'intervenaient pas seulement dans la formation de la fibrine, mais qu'ils étaient nécessaires aussi à la formation du fibrin-ferment. En réalité, comme l'a montré surtout *Hammarsten* (3), les sels calcaires sont nécessaires à la première phase de la coagulation, c'est-à-dire à la formation du fibrin-ferment ; ils ne sont pas indispensables pour la formation de la fibrine ; ils sont seulement adjuvants de la transformation du fibrinogène en fibrine.

A ce moment, la plupart des physiologistes se rendaient bien compte que la formation du fibrin-ferment était assez compliquée ; ils étaient conduits à admettre l'existence de proferments, de zymogènes et de thrombokinases. Les recherches de *Pekelharing*, de *Delezenne*, de *Hammarsten*, *Morawitz*, *Fuld et Spiro* amenèrent les auteurs à considérer la production du fibrin-ferment ou thrombine comme due surtout à l'union des sels calcaires avec une thrombokinase d'origine cellulaire, thrombokinase dont la constitution chimique était celle des nucléo-protéides. A ces deux ordres des corps s'ajoutait aussi pour former la thrombine, des substances contenues dans le plasma (thrombogène) de sorte que le fibrin-ferment était considéré ainsi comme dû à l'union d'au moins trois ordres de substances : substances cellulaires (thrombokinase) (4), substances plasmatiques (thrombogène) (5), sels calcaires.

La formation du fibrinogène, c'est-à-dire de la fibrine soluble, n'est pas mieux éclaircie. Tout le monde s'entend aujourd'hui pour le considérer comme préexistant dans le plasma circulant. Il ne provient donc pas de la destruction extravasculaire des éléments figurés du sang. Le fibrinogène disparaît du sang dans l'intoxication phosphorée mortelle qui, comme on le sait, lèse gravement le foie. Lorsqu'on fait des saignées successives à un chien et qu'on réinjecte le sang après lui avoir enlevé sa fibrine par le battage, le fibrinogène est rapidement régénéré. Ces observations ont été le point de départ de travaux dans lesquels on a cherché à localiser dans les tissus l'origine du fibrinogène régénéré. Le foie, l'intestin, le tissu lymphoïde en général et particulièrement la moelle osseuse ont été considérés comme les sources les plus importantes du fibrinogène.

Les physiologistes s'étaient d'abord figuré la production de la fibrine et du fibrin-ferment comme des combinaisons chimiques, comme des combinaisons calciques

(1) Arthus et Pagès, *Archives de Physiologie*, XXII, 1890 et Arthus, *Archives de Physiologie*, XXVIII, 1896.

(2) Pekelharing, *Int. Beiträge z. wiss. Med.*, 1891 ; *Deutsche Med. Woch.*, 1892; *Zentralblatt f. Physiologie*, 1895.

(3) Hammarsten, *Zeitschrift f. phys. Chemie*, XXII, 1896-97 et *Zeitschrift f. Biologie*, XXVIII, 1899.

(4) Cytozyme.

(5) Sérozyme, plasmozyme.

de corps albuminoïdes. Sous l'influence des notions nouvelles obtenues sur l'état colloïdal, on peut comparer aujourd'hui la formation de la fibrine à la précipitation des colloïdes. Les substances albuminoïdes, plasmatiques, qui entrent dans la formation de la fibrine ne sont pas à proprement parler dissoutes dans le plasma, mais à l'état d'émulsions extrêmement fines. Ces substances, tout au moins un grand nombre d'entre elles, ne constituent pas des entités chimiques définies, mais des groupements de molécules, combinaisons physiques très instables que l'on nomme des complexes. Ces complexes ne répondent pas aux lois des combinaisons chimiques ; l'agglutination de leurs particules en suspension, leur précipitation, peut se produire sous l'influence de causes et d'agents très divers. Elle peut être provoquée par la présence d'ions libres qui forment avec eux des combinaisons d'adsorption. La précipitation de la fibrine et particulièrement la formation de la fibrine aux dépens du fibrinogène peut être considérée aujourd'hui comme un phénomène de ce genre ; elle est le résultat de la précipitation de plusieurs colloïdes les uns par les autres. Elle représente en somme un changement d'état physique, un nouveau mode de groupement moléculaire. Dans ces conditions, le rôle des sels de chaux, agissant probablement par leur ion Ca, serait simplement un rôle adjuvant et l'on comprend alors plus facilement la diversité des agents coagulants, la multiplicité des facteurs de la coagulation et l'apparence si compliquée des phénomènes qui interviennent pour l'accélérer ou l'empêcher.

Intervention des éléments figurés du sang dans la coagulation. — Parmi les facteurs de la coagulation, il en est un qui nous intéresse tout spécialement. C'est le rôle qu'on attribue presque généralement aux cellules sanguines et aux cellules de l'endothélium vasculaire dans la production de ce phénomène. Leur intervention dans la coagulation a été admise, non seulement pour la formation du fibrin-ferment ou thrombine, mais même pour le renouvellement du fibrinogène.

La plupart des auteurs, depuis *Schmidt*, ont vu dans les leucocytes la source du fibrin-ferment. *Schmidt* croyait que dans le sang sorti des vaisseaux, les leucocytes se détruisaient rapidement ; cette destruction mettait en liberté le fibrin-ferment. La théorie de *Schmidt* reposait sur une idée préconçue, celle de la fragilité extrême des leucocytes ; mais c'est là une idée fausse, et, comme nous l'avons vu, les leucocytes peuvent être conservés vivants *in vitro* pendant un temps considérable (1). Pendant la coagulation, les leucocytes ne sont pas détruits, puisqu'on les retrouve dans le caillot (2). Quand on suit progressivement la précipitation de la fibrine, on voit, dans la portion de sang restée liquide, les leucocytes diminuer de nombre

(1) Jolly, *S.e de Biologie*, 7 novembre 1903, 9 juillet et 22 octobre 1910, 22 juillet 1911 et 26 avril 1913.

(2) Dastre, *S. de Biologie*, 14 novembre 1903 ; — Hayem, *Union médicale*, 1882 et *Du sang*, p. 286.

avec rapidité ; le fait est frappant et il n'est pas besoin de numérations pour le constater. Les cellules qui subsistent sont parfaitement vivantes ; elles ont des mouvements amiboïdes actifs, elles ne paraissent pas altérées et ne montrent, sur les préparations fixées et colorées, aucun phénomène de dégénérescence, mais seulement les excroissances périphériques arrondies dont nous avons déjà parlé et qui ne se forment guère que sur les gros lymphocytes. Les polynucléaires, facilement reconnus à l'état frais dans le sang de l'homme et surtout dans le sang du lapin, et les éosinophiles, très faciles à reconnaître dans le sang vivant, chez l'homme, le chien et surtout chez le cheval, ont des mouvements amiboïdes actifs.

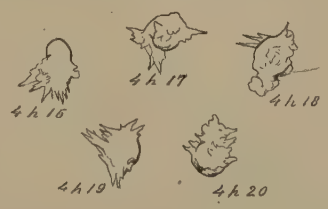


Fig. 264. — Dissociation, après 20 heures, d'un caillot de sang humain. Mouvements amiboïdes d'un leucocyte examinés à la température de 32°.

Les expériences faites en fixant convenablement du sang après une, deux ou trois minutes de séjour sur la lame de verre, ne montrent aucune altération bien notable des leucocytes. Tous ces faits sont absolument contraires à l'idée de la fragilité de ces cellules et de leur destruction.

Fig. 265. — Lapin. Mouvements d'un leucocyte obtenu par la dissociation d'un caillot sanguin formé *in vitro* depuis 48 heures.

Après la rétraction du caillot, le sérum exsudé contient très peu de leucocytes. Ceux qu'il renferme, observés après quelques heures, sont, en général, encore vivants. Si, après 12 ou 24 heures, on agite doucement un petit fragment de caillot dans ce sérum, on met en liberté, en même temps que des hématies, un grand nombre de leucocytes et aussi bien des polynucléaires que des lymphocytes. La plupart de ces cellules sont vivantes et présentent des mouvements amiboïdes (1). Elles ont été mises en liberté avec la plus grande facilité ; elles n'adhéraient donc pas à la fibrine. La dissociation avec des aiguilles d'un fragment de caillot dans le sérum donne les mêmes résultats (2). Enfin, l'observation directe au microscope de la formation du réseau fibri-

(1) Jolly, *S. de Biologie*, 22 juin 1918.

(2) Les préparations fixées et colorées montrent toujours un certain nombre de cellules altérées, surtout si on attend plus de vingt-quatre heures ; mais ces altérations se produisent très lentement.

neux, permet aussi de constater que les leucocytes n'ont aucun rapport avec lui. Ils continuent leurs mouvements de reptation à la surface du réseau ou même entre ses mailles.

Les leucocytes ne sont donc pas détruits dans la coagulation du sang pas plus que dans la coagulation de la lymphe. Ils restent longtemps vivants dans le caillot même. Leurs altérations morphologiques ne se produisent que lentement et après la précipitation de la fibrine.

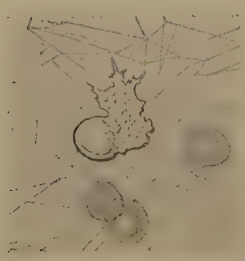


Fig. 266. — Sang d'homme. Préparation sans réactif examinée à 32°. Leucocyte cheminant avec rapidité à travers le réseau fibrineux précipité. 750 diam.

Mais si les leucocytes ne se détruisent pas pendant la coagulation, ils pourraient encore donner au sang et à la lymphe, par sécrétion ou par diffusion, des proferments. Une pareille manière de voir, qui attribue encore aux leucocytes un rôle important dans la coagulation, s'appuie surtout sur les faits suivants : Les leucocytes se trouvent dans tous les liquides spontanément coagulables (sang, lymphe). Les transsudats séreux sont spontanément coagulables quand ils sont riches en globules blancs. Le sérum obtenu par la coagulation du sang complet est riche en fibrin-ferment tandis que le plasma du sang sédimenté et pauvre en cellules, est peu coagulable spontanément. Quand on fait sédimenter du sang de cheval à 0°, c'est avec la couche de globules blancs, superficielle, qu'on obtient le plus de fibrin-ferment. Quand on porte à la température ordinaire du sang de cheval qui a sédimenté à 0°, la fibrine apparaît d'abord dans les couches profondes du plasma, au voisinage de la couche de globules blancs. Le liquide d'hydrocèle, non spontanément coagulable, coagule fortement par addition de la couche de globules blancs du sang sédimenté ou par addition de globules de pus.

Mais on peut cependant arriver à préparer des plasmas purs, privés d'éléments cellulaires et qui coagulent spontanément. On recueille du sang de lapin avec une canule paraffinée introduite dans la carotide ; le sang est reçu dans des tubes paraffinés et il est centrifugé. Le plasma obtenu de cette façon, privé de toute cellule, se coagule spontanément et rapidement quand il est placé au contact du verre (1).

(1) Les plasmas incoagulables d'oiseaux obtenus par sédimentation après récolte à l'abri des sucs tissulaires (Delezenne) sont incoagulables spontanément, mais coagulent si on les dilue avec de l'eau distillée à laquelle on a ajouté un peu de chlorure de calcium. Voir Nolf, coagulation *in* Gilbert et Weinberg, *Traité du sang*, 1913, 1.

Dans la partie superficielle du dépôt obtenu par la sédimentation du sang, il n'y a pas que des leucocytes. Les observations microscopiques ont montré que ce dépôt, qui depuis longtemps avait attiré l'attention des physiologistes et dans lequel ils avaient voulu voir la source du fibrin-ferment, est constitué en réalité par un mélange de plaquettes et de leucocytes. Par des centrifugations répétées, on arrive même à séparer les globulins, plus légers et plus superficiels encore dans le dépôt (1).

On a donc pu comparer l'action des leucocytes et des globulins sur le plasma salé et le liquide d'hydrocèle. Et les globulins se sont montrés beaucoup plus énergiques que les les leucocytes. Mais les suspensions de leucocytes obtenues par centrifugation sont toujours plus ou moins mélangées de plaquettes. *Bordet* et *Delange* se sont adressés à une autre méthode en produisant par injection de bouillon dans le péritoine des exsudats exempts de plaquettes (2).

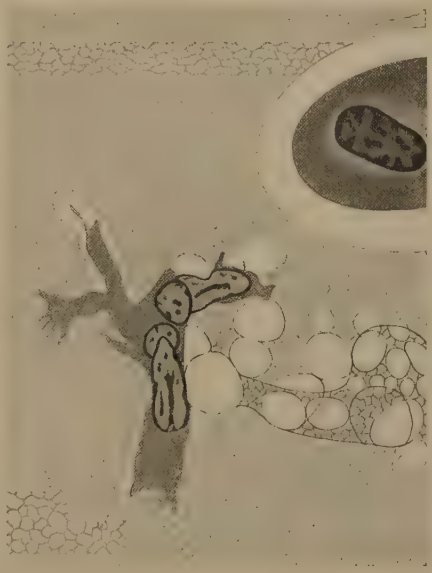


Fig. 267. — Sang de salamandre. Leucocyte fixé pendant ses mouvements de progression à travers la membrane de fibrine, dont il a rompu la trame. A droite en haut, hématie; le réseau de fibrine, légèrement rétracté par la fixation, ne lui adhère pas. D'après Meves.

On a donc aujourd'hui une certaine tendance à attribuer aux globulins, dans la coagulation, le rôle que depuis *Buchanan* et *Schmidt*, on attribuait aux leucocytes. En dehors de leur action sur la rétractilité du caillot, les plaquettes seraient les principales sources de la thrombine. Mais cette action n'est pas spécifique. La lymphe, qui ne contient pas de plaquettes, coagule pourtant spontanément et le cytozyme peut être fourni, semble-t il, par

(1) Mosen, *Archiv fur Anatomie und Physiologie, phys. Abth.*, 1893; — Le Sourd et Pagniez, *C. R. Académie des Sciences*, 25 juin 1906; — Burker, *Pfluger's Archiv*, CII, 1904.

(2) Bordet et Delange, *Annales Pasteur*, 1912 et 1913; — Gratia, *Journal de Physiologie et de Pathologie générales*, XVII, 1917-1918; — Le Sourd et Pagniez, *Société de Biologie*, 21 juillet et 8 décembre 1906, *Journal de Physiologie*, 1907, 1909, 1911 et 1913.

d'autres éléments. Il est probable que les plaquettes jouent surtout, dans la coagulation, un rôle de surface. Elles n'interviennent probablement pas dans les premiers temps du phénomène, déclenché surtout par le suc des tissus. Par leur nombre et leur petite taille, elles offrent à la fibrine une surface considérable qui favorise sa précipitation.

Le rôle des éléments figurés du sang dans la production de la thrombine et du fibrinogène a été aussi compris d'une autre manière. A la suite des expériences faites sur le rôle coagulant des extraits d'organes, on a voulu voir dans le tissu lymphoïde en général et particulièrement dans la moelle ossseuse une des sources de la thrombine (1) et du fibrinogène (2) ; mais ces faits ne sont pas encore suffisamment établis.

La coagulation du sang, envisagée autrefois comme un phénomène d'ordre chimique, se produisant par la réaction de substances spécifiques, provenant en partie d'éléments figurés déterminés, nous apparait plutôt aujourd'hui comme un phénomène physique ou physico-chimique. On peut l'imaginer comme une précipitation de substances à l'état colloïdal et peu stables, précipitation dans laquelle les actions de surface jouent un rôle considérable et à laquelle les éléments figurés du sang et des tissus n'apportent qu'un rôle adjuvant ou déterminant, en tous cas, nullement spécifique. Les globules rouges et les leucocytes paraissent y jouer un rôle encore moins important que les globulins. Ces derniers interviennent dans la rétraction du caillot (3).

Substances anticoagulantes. Action du citrate de soude. Application à la technique de la transfusion du sang. — Un certain nombre de substances ajoutées au sang *in vitro*, l'empêchent de se coaguler. L'oxalate de potasse, le fluorure de sodium, empêchent *in vitro* la coagulation parce qu'ils précipitent les sels de chaux, décalcifient le sang et empêchent par suite la formation de la thrombine. Le citrate de soude, à la dose de 2 à 3 p. 100 a une action du même genre (4) ; il ne précipite pas les sels de chaux, mais il empêche ou

(1) Drinker, *Am. Journal of Physiology*, XLI, 1916 ; — Howell, *Am. J. of Physiology*, XXXV, 1914. La moelle osseuse contiendrait des quantités considérables de prothrombine qui proviendraient des mégakaryocytes. Ces vues sont à rapprocher de celles de Wright sur l'origine des plaquettes.

(2) Morawitz, 1905, *l. c.*

(3) Voir plus haut. Par l'addition de tissu de moelle osseuse et surtout de rate, Le Sourd et Pagniez (*S. de Biologie*, 2 décembre 1911), obtiennent la rétraction de caillots irrétractiles. Ils attribuent cette influence aux plaquettes.

(4) Arthus, *S. de Biologie*, 10 mai 1902.

diminue leur dissociation en ions Ca; il gêne donc la formation de la thrombine, les sels de chaux n'agissant dans la coagulation qu'à l'état d'ionisation (1).

L'addition de citrate au sang, à la dose nécessaire pour obtenir son incoagulabilité, ne modifie pas d'une manière appréciable les propriétés physiques, et en particulier la tension osmotique du plasma; à condition de prendre certaines précautions, elle n'altère pas les éléments figurés du sang et en particulier les hématies. Ces propriétés ont été appliquées à la transfusion du sang dont la technique a été complètement renouvelée dans ces dernières années: on injecte maintenant du sang rendu incoagulable et on se préoccupe de n'injecter qu'un sang dont le plasma soit sans action nocive sur les hématies du sujet récepteur.

On peut employer pour l'ajouter au sang, une solution de citrate de soude isotonique (voisine de 4 p. 100). Mais en général, on utilise des solutions plus fortes, à 10 p. 100, afin de diminuer la quantité d'eau ajoutée au sang. Ces solutions hypertoniques arrivent au sang trop lentement pour être nuisibles.

Les solutions de citrate de soude qui exercent *in vitro* une action anticoagulante, n'altèrent pas notablement les hématies. Entre 4 et 20 p. 100, elles ne sont pas hémolytiques. Dans les mélanges employés pour la transfusion, la quantité de sang en présence de la solution est trop grande pour qu'on ait à craindre l'hémolyse. Les altérations de forme, les bosselures des globules rouges, sans hémolyse, n'ont pas d'inconvénients, car les hématies, ainsi déformées, reprennent, dans le plasma, leur aspect discoïdal (2).

Les propriétés physiologiques de ces hématies ne sont pas modifiées non plus, car le sang citraté devient rouge par agitation à l'air. Les globulins sont également conservés (3).

Chez un animal saigné à blanc, l'injection de sang citraté en quantité égale au volume du sang soustrait empêche la mort et permet la restauration du sang, grâce aux nouveaux globules ajoutés. Les effets toxiques du citrate sur les centres nerveux sont en général fugitifs et la dose toxique est du reste supérieure à celle qui est employée dans les transfusions. La transfusion du sang citraté n'empêche nullement le sang de l'individu récepteur de se coaguler *in vitro*. Le sang reste coagulable; dans certaines

(1) Sabbatani, *S. de Biologie*, 14 juin 1902.

(2) Hédon, *Archives de méd. exp.*, 1902; *Ass. des Anatomistes*, IV, Montpellier, 1902, et *Journal méd. français*, VIII, mai 1919. Voir aussi ch. II et ch. IX.

(3) Achard et Aynaud, *S. de Biologie*, 21 novembre 1908.

expériences, le temps de coagulation a paru seulement un peu augmenté (1).

Modifications pathologiques de la coagulation du sang. Mesure clinique. — La coagulation du sang peut être modifiée dans certains états pathologiques. L'augmentation de densité du réticulum fibrineux, obtenu dans une préparation de sang fraîche par les méthodes que nous avons indiquées plus haut, peut être observée dans certaines maladies aiguës et en particulier dans la pneumonie ; le fait coïncide avec un retard dans la coagulation (2). La rapidité et l'énergie de la coagulation peuvent être en effet modifiées dans les maladies. La plupart des procédés qui ont été proposés pour apprécier en clinique les variations de la coagulation reposent sur l'appréciation de la vitesse que met le sang à se prendre en masse *in vitro*, depuis celui de *Vierordt* (3) jusqu'à ceux de *Brodie* et *Russell* (4) et de *Wright* (5). Un des plus simples est de remplir de petits tubes dont le calibre est toujours le même, et qui ont été bien nettoyés et flambés au rouge. On note le moment où le sang est pris en masse (6).

Lorsque c'est le sang de la piqûre du doigt qui est employé, le suc des tissus intervient toujours un peu pour modifier les résultats obtenus. L'innocuité de la prise de sang dans la veine a permis d'employer ce procédé pour les évaluations cliniques. Le sang est recueilli dans un tube ou dans une éprouvette par piqûre de la veine avec un petit trocart stérilisé à sec. Cette méthode permet d'apprécier les grands retards de la coagulation du sang qu'on observe par exemple dans l'hémophilie.

On a aussi tiré des conclusions cliniques de l'aspect du caillot qui, dans certains cas, dans l'hémophilie par exemple, présente une partie superficielle blanche parce que la sédimentation des globules rouges s'est faite avant la coagulation complète (7), et qui, dans d'autres circonstances, est irrétractile (8).

On a cherché à apprécier la coagulation d'une autre manière, en

(1) La dose qui, *in vivo*, rendrait le sang incoagulable est beaucoup plus forte que la dose toxique mortelle ; l'expérience ne peut être faite que sur des animaux maintenus en vie par la respiration artificielle (Hédon, *J. méd. français*, *l. c.*, 1919).

(2) Hayem, *Du Sang*, p. 476.

(3) Vierordt, *Archiv f. Heilkunde*, 1878.

(4) Brodie et Russell, *J. of Physiology*, XXI, 1897.

(5) Wright, *J. of Physiology*, XVIII, 1902.

(6) Cf. Pagniez, *Société de Biologie*, 1922. Voir aussi Milian, *Société de Biologie*, 25 mai, 1er et 29 juin 1901, et *Presse médicale*, 1904, et Jacquot, Thèse Paris, 1904.

(7) Claude O., Thèse Paris, 1908.

(8) Hayem, *Du Sang*.

mélangeant le sang à des solutions anticoagulantes et en mesurant l'aptitude à coaguler par le titre de la solution anticoagulante qu'on est obligé d'ajouter pour empêcher la coagulation. Les procédés de *Wright* (1) (oxalate de potasse), de *Brissaud* (2) (chlorure de sodium), reposent sur ce principe ; mais jusqu'ici, ils n'ont pas donné de résultats bien satisfaisants.

On a aussi employé dans le même but le citrate de soude qui conserve le sang fluide sans altérer son aptitude à coaguler. Dans le procédé proposé par *Bloch* (3), le sang est citraté au sortir du vaisseau dans la proportion de 1 centigramme de citrate de soude pour 1 cc. de sang. On ajoute ensuite des quantités croissantes d'une solution de chlorure de calcium à 0,5p. 1. 000. La quantité de calcium qu'il est nécessaire d'ajouter pour obtenir la coagulation permet d'évaluer l'aptitude du sang à coaguler. On observe le début du phénomène et la coagulation complète. On peut constater de cette façon un abaissement très net de la coagulabilité chez les sujets normaux après les hémorragies, dans les affections du foie (insuffisance hépatique, ictère grave) et du rein (néphrite), dans la tuberculose pulmonaire, la fièvre typhoïde. L'aptitude à coaguler semble plus grande au contraire dans la pneumonie, maladie dans laquelle l'abaissement de la coagulabilité serait d'un pronostic grave.

Il existe, chez l'homme, des états pathologiques dans lesquels le sang présente une aptitude moindre à coaguler ; les hémorragies provoquées chez ces sujets par des traumatismes minimes ont moins de tendance à s'arrêter. Ces états pathologiques ont été groupés sous le nom d'*hémophilie* (4). L'hémophilie est en général une disposition congénitale et familiale. La coagulation du sang retiré de la veine est plus lente ; la sédimentation du sang se produit avant que la coagulation soit complète, de sorte que la partie superficielle du caillot est blanche, privée d'hématies.

Le sang recueilli par piqûre du doigt coagule souvent dans un temps normal, probablement par suite du mélange d'un peu de plasma des tissus. Dans ces états hémophiliques, le poids de fibrine extrait du sang est normal, la teneur en sels de calcium est normale.

(1) Wright, *J. of Physiology*, 1902.

(2) E. Brissaud, Th. Paris, 1911.

(3) M. Bloch, Thèse Paris, 1914. On a essayé de ralentir la coagulation en recueillant le sang dans l'huile de vaseline (Achard et Binet, *S. de Biologie*, 10 novembre 1917).

(4) P. E. Weil, *Presse médicale*, 1905; *S. méd. des Hôpitaux*, 26 octobre et 2 nov. 1906; — Nolf et Herry, *Revue de médecine*, 1909 et 1910 ; — Morawitz et Lossen, *Deutsches Archiv f. klin. Medicin*, XCIV, 1908; — Addis, *J. of Path. a. Bacter.*, XV, 1911; — Herry, *S. de Biologie*, 19 mars 1910; — Pagniez, in *Traité de Pathologie de* Sergent, X, 1922.

Les éléments figurés du sang paraissent le plus souvent normaux comme structure et comme nombre. Le sang est coagulable par addition de sérum humain ou d'extraits d'organes qui lui apportent les substances capables de transformer le fibrinogène en fibrine. L'inaptitude à coaguler paraît ainsi due à un trouble dans la formation du fibrin-ferment.

Il existe d'autres états pathologiques dans lesquels, à l'hémophilie s'ajoute une disposition de l'organisme à faire des hémorragies spontanées. Ces troubles se voient particulièrement dans les lésions graves du foie, soit spontanées (ictère grave, intoxication phosphorée, cirrhose alcoolique), soit expérimentales, et particulièrement dans l'intoxication phosphorée expérimentale, dans l'intoxication chloroformique, etc. On observe, l'apparition d'hémorragies spontanées au niveau des muqueuses. La coagulabilité du sang est diminuée ; la quantité de fibrine produite dans le caillot est petite. Le trouble de la coagulation paraît donc tenir à une diminution du fibrinogène dont la formation appartiendrait en partie au foie. Les hémorragies spontanées ont été attribuées à une altération vasculaire due à la substance toxique.

A côté de ces états hémorragiques d'origine toxique, en rapport avec une lésion grave du foie et dans lesquels le trouble de la coagulation paraît dû surtout à la diminution des constituants de la fibrine, il faut placer tout un groupe d'affections disparates presque toujours d'origine infectieuse où le tableau clinique est caractérisé essentiellement par l'apparition d'hémorragies spontanées, particulièrement au niveau de la peau et des muqueuses : ce sont les *purpuras* (1). Ici, l'étude de la coagulation du sang donne des résultats très variés : le caillot peut se former normalement, les éléments figurés, étant normaux de nombre et d'aspect. Le plus souvent cependant le caillot n'est pas rétractile et cette absence de rétractilité coïncide en général avec une notable diminution du nombre des globulins. Le retard de la coagulation est exceptionnel alors qu'il est la règle dans l'hémophilie (2). Le temps de saignement est prolongé d'une manière considérable, tandis qu'il est le plus souvent normal dans l'hémophilie (3). Le fait a été attribué à l'absence des globulins.

(1) Hayem, *Du Sang* ; — Bensaude, *Soc. méd. des H.*, 15 janvier 1897 ; — Lenoble, Thèse Paris, 1898 ; — Gilbert et E. Weil, *S. de Biologie*, 29 octobre 1898 ; — Grenet, Thèse Paris, 1905 ; — P. E. Weil, *S. de Biologie*, 8 décembre 1906 ; — Nobécourt et Tixier, *S. méd. des Hôpitaux*, 21 octobre 1910 ; — Bensaude, *S. de Biologie*, 23 janvier 1904.

(2) E. Weil, *Revue de médecine*, 1920.

(3) Duke, *J. Am. med. Ass.*, LV, 1910. On fait une incision nette de la peau du lobule de l'oreille ; les gouttes de sang, recueillies de demi-minute en demi-minute sur du papier

On ne connaît pas encore la pathogénie des troubles de la coagulation dans les purpuras; on a constaté des lésions du foie à certaines autopsies; mais la cause des modifications de la coagulation n'est peut-être pas toujours identique.

Certaines anémies graves, les leucémies, présentent souvent des hémorragies analogues à celles des purpuras, avec des troubles analogues de la coagulation. L'absence de rétractilité du caillot avec diminution du nombre des plaquettes a été signalée par *Hayem*.

Les travaux d'*Arthus* sur l'importance des sels de chaux dans la coagulation ont donné l'idée d'appliquer ces données expérimentales au traitement des états hémorragiques. *Wright* a introduit dans la thérapeutique l'usage du chlorure de calcium qui, à petites doses, *in vitro*, accélère la coagulation, mais dont l'effet, *in vivo*, par ingestion, n'est nullement prouvé. On a recommandé aussi l'injection sous-cutanée de sérum de cheval (1) dont l'effet paraît certain, et qui semble agir par son fibrin-ferment, et aussi l'injection sous-cutanée de propeptone (2) qui aurait des effets aussi satisfaisants que le sérum de cheval sans exposer aux dangers des accidents anaphylactiques.

PLASMA ET SÉRUM

Le liquide exsudé du caillot est le sérum. Il représente la partie liquide du sang moins la fibrine. Il n'est donc pas identique au plasma qui, lui, représente toute la partie liquide du sang. Le sérum ne coagule pas spontanément; la coagulation spontanée du plasma oblige à employer des procédés spéciaux pour le préparer; on s'adresse à des sangs peu coagulables, sang de cheval ou d'âne, et surtout sang d'oiseau, recueillis à l'abri du suc des tissus et que l'on centrifuge.

Le sérum pur est un liquide transparent, incolore, d'une densité voisine de 1030. Il est très légèrement ambré chez quelques animaux. Chez l'homme, il est presque toujours incolore. Il peut secondairement être coloré par suite de la présence de globules rouges accidentellement hémolysés. Le sérum normal ne contient pas d'hémoglobine. A l'état pathologique, le sérum peut être coloré par l'hémoglobine dissoute; ce sérum « laqué » est coloré d'emblée, au fur et à mesure qu'il se produit; cette coloration est la conséquence de l'hémoglobinémie, c'est-à-dire de la dissolution de l'hémoglobine dans le plasma sanguin. On observe, dans ce cas, fréquemment, la transformation de l'hémoglobine en méthémoglobine (méthémoglobinémie). Ces faits se voient dans l'hémoglobinurie paroxystique et dans les hémoglobinuries toxiques, dues aux poisons du sang, accidentelles ou expérimentales (Voir ch. IX et ch. XVI).

Même à l'état normal, le sérum est quelquefois fluorescent. Cette fluorescence

buvard, s'arrêtent brusquement au bout de 3 minutes environ, chez l'homme normal et dans la plupart des maladies. Ce temps de saignement est considérablement augmenté (20, 30, 60 minutes) dans les états hémorragiques et les grandes anémies.

(1) P. E. Weil, *Presse médicale*, octobre 1905.

(2) Nolf et Herry, *Revue de médecine*, 1909.

verte est surtout accrue à l'état pathologique, lorsque le sang renferme des pigments biliaires ; la présence de l'urobiline seule en quantité notable peut donner cet aspect. Chez les malades atteints d'ictère, le sérum peut présenter une coloration jaunâtre qui tient à la présence des pigments biliaires. Lorsqu'il existe de la bilirubine, la coloration jaune du sérum est souvent très nette ; par l'examen spectroscopique, on constate l'absorption de la partie droite du spectre ; l'action de l'acide azotique fait apparaître la teinte verte caractéristique indiquant l'oxydation de la bilirubine en biliverdine (réaction de Gmelin). L'urobiline peut être associée dans le sérum à la bibirubine ; elle peut y exister seule. Grâce à sa grande diffusibilité, on peut l'obtenir dans les parties supérieures du liquide en versant un peu d'eau distillée au-dessus du sérum. Elle donne, à l'examen spectroscopique, une bande d'absorption entre le bleu et le vert.

L'aspect laiteux du sérum peut être observé dans un certain nombre de cas. Si le phénomène est peu marqué, le sérum est dit opalescent ; s'il est très net, le sérum est dit lactescent. A l'état physiologique, l'opalescence est visible pendant la période digestive ; la lactescence s'observe chez les animaux allaités, les nourrissons, les adultes soumis au régime lacté. Elle est due alors à la présence de granulations graisseuses. A l'état pathologique, on observe l'opalescence du sérum chez beaucoup de malades atteints de néphrite aiguë, tandis qu'on ne la trouve pas dans la néphrite interstitielle chronique. Au microscope, on voit alors des granulations extrêmement fines qui n'ont pas exactement les réactions des substances grasses et qui sont formées probablement de lipoïdes unies à des substances albuminoïdes ; elles n'auraient donc pas absolument la même composition que celles des sérums lactescents physiologiques et proviendraient en partie de la nécrose des protoplasmas cellulaires. L'opalescence du sérum a été quelquefois obtenue expérimentalement chez l'animal par des infections ou des intoxications.

Les granulations extrêmement fines dont la présence donne aux sérums opalescents et lactescents leur aspect spécial sont difficile à voir dans les conditions ordinaires de l'observation microscopique ; on les observe au contraire facilement à l'ultra-microscope (Voy. plus bas).

Le sérum contient des substances albuminoïdes, parmi lesquelles on a isolé des globulines, une albumine qui a été obtenue à l'état cristallisé, une nucléoprotéide ; dans certains cas pathologiques, on y a trouvé des albumoses (voir ch. XVII). Le sérum, à l'état physiologique, contient encore des hydrates de carbone (glucose), des graisses neutres, des lipoïdes (cholestérine, savons, etc.), de l'urée, de l'acide urique, de l'ammoniaque, de la xanthine, de la glycérine, des acides organiques (lactique, hippurique), enfin des substances minérales, parmi lesquelles les plus importantes sont la soude et le chlore, à l'état de chlorure de sodium et de carbonate de soude et, en petite quantité, du phosphore, de la chaux, de la magnésie, de l'iode. La potasse et le fer n'y existent qu'à l'état de traces (1).

Le sérum contient des ferments (oxydases, amylase, lipase ou monobutyrinase, etc.).

La plupart des substances qui se trouvent contenues dans la partie liquide du sang se trouvent à l'état colloïdal, c'est-à-dire à l'état de suspensions ou d'émulsions extrêmement fines, dépassant de beaucoup le pouvoir de l'observation micro-

(1) Pour la composition chimique du plasma et du sérum, le pouvoir rotatoire, l'indice de réfraction, voir les *Traités de physiologie et de Chimie physiologique.*

scopique. Les granules peuvent être séparés les uns des autres (solutions colloïdales ou sols) ou rapprochés, agglutinés en une trame spongieuse (gels). Entre ces deux états physiques se trouve un grand nombre d'états intermédiaires ; de plus, le liquide qui sépare les granules contient des électrolytes dont les ions sont capables de se fixer sur les granules et de former avec eux des édifices physico-chimiques d'une complexité très grande.

Nous devons donc nous figurer le sang comme une suspension microscopique d'éléments anatomiques libres, entre lesquels se trouvent des éléments plus petits, encore appréciables au microscope (granulations lipoïdes, etc.), au-dessous desquels se trouvent des granules encore plus petits, échappant aux moyens ordinaires d'investigation.

Cet état colloïdal des constituants du sang jette, comme nous l'avons vu, beaucoup de lumière sur l'idée que nous devons nous faire de la coagulation. Il permet aussi, dans une certaine mesure, d'expliquer les nombreuses propriétés biologiques que possèdent à l'état normal les sérums ou qu'ils sont capables d'acquérir dans certaines conditions : propriétés diastasiques, précipitantes, agglutinantes, toxiques, antitoxiques, hémolytiques, cytotoxiques, bactériolytiques, etc. Les phénomènes de surface jouent certainement un rôle considérable dans l'apparition de ces propriétés.

L'étude des propriétés biologiques des sérums ne rentre pas dans le cadre de cet ouvrage ; nous renvoyons le lecteur aux traités spéciaux. Nous avons déjà fait allusion à l'importance de la constitution physico-chimique du sang pour interpréter les phénomènes de choc, les phénomènes d'immunité et la coagulation. Parmi les propriétés biologiques des sérums, nous nous arrêterons seulement aux propriétés hémolytiques (ch. IX) ; ici en effet, la réaction se passe entre le sérum et les éléments anatomiques du sang. L'agglutination et la destruction des globules rouges est un phénomène microscopique dont l'étude est capable de nous faire entrer plus avant dans la connaissance des hématies.

La teneur du sérum en substances albuminoïdes peut varier à l'état physiologique et surtout dans les états pathologiques. Elle permet d'apprécier dans certains cas les variations de la dilution sanguine et l'hydrémie, qu'on rencontre, par exemple, dans les maladies des reins (1). Elle peut être mesurée par l'indice de réfraction qu'on obtient à l'aide des *réfractomètres* (2).

OBSERVATION ULTRA-MICROSCOPIQUE DU SANG

Le pouvoir définissant du microscope a des limites qui ne dépendent pas seulement de la puissance du système optique, mais qui dépendent aussi de la nature même de la lumière. La luminosité des objets est due à des mouvements très rapides, à des vibrations ou ondes dont l'amplitude est très petite et va en augmentant de la partie violette à la partie rouge du spectre. Les longueurs d'onde sont de l'ordre du dixième de μ. Si l'objet, bien que très petit, est un élé-

(1) VAUCHER, Th. Paris, 1911.

(2) STRAUSS et CHAJES, *Zeitschrift f. klin. Med.*, LII, 1904 ; — CASTAIGNE et CHIRAY, *S. de Biologie*, 27 janvier 1906 ; — ASHER, in *Handbuch der phys. Methodik* de ABDERHALDEN.

ment d'un diamètre de plusieurs μ (globule rouge ou leucocyte, etc.), les vibrations qui agitent chacun des points de sa surface seront, par rapport à sa taille, trop petites pour troubler la vision de sa forme. Mais si l'on suppose l'objet de plus en plus petit, il arrivera un moment où son diamètre étant très voisin de l'amptitude de la vibration, la vision de sa forme ne pourra plus être distincte, même en imaginant des systèmes optiques dix fois, cent fois plus forts que nos plus puissants objectifs. On considère que, théoriquement, cette limite est représentée par la longueur d'onde ; par conséquent, un objet d'un diamètre inférieur à 0 μ 4 ne peut plus guère être nettement défini ; on ne peut plus voir exactement sa forme ; et cette limite théorique est peu éloignée des résultats de l'expérience. Si, de plus, on considère deux particules voisines, et si on les suppose de plus en plus rapprochées, il arrive un moment où les vibrations lumineuses dont elles sont animées confondront leurs images.

On a cherché à augmenter le pouvoir du microscope en se servant, pour l'éclairage, des radiations de courte longueur d'onde de l'ultra-violet. On a enfin imaginé d'examiner les objets vivement éclairés sur un fond noir : un rayon de soleil arrivant dans une pièce obscure, éclaire des particules très fines qui sans lui auraient été absolument invisibles.

Depuis longtemps, et même avant l'emploi des méthodes histologiques, les observateurs au microscope avaient imaginé de faire arriver la lumière réfléchie par le miroir, obliquement, en plaçant le miroir de côté ou en décentrant le diaphragme ; ils augmentaient ainsi l'ombre portée et la visibilité de l'objet. Si l'on supprime le miroir, les objets, recevant et réfléchissant la lumière, apparaissent éclairés sur un fond noir. En 1903, *Siedentopf* et *Zsigmondy* puis *Cotton* et *Mouton* (1), imaginèrent de projeter latéralement un faisceau lumineux qui éclairait vivement les objets et ne pénétrait pas l'objectif, celui-ci ne recevant que la lumière réfléchie pour chaque particule qui apparaissait alors vivement éclairée sur un fond noir. C'est à ces procédés qu'on donne le nom d'*ultra-microscopie*. Cette méthode permet de reculer la limite de visibilité ; mais les particules éclairées plus petites que la longueur d'onde ne sont pas définissables quant à leur forme ; elles n'apparaissent que comme des points brillants et scintillants.

(1) Cotton et Mouton, *C. R. Ac. des Sciences*, 29 juin 1903 ; *Revue gén. des Sciences* XIV, 1903 ; *les Ultramicroscopes et les objets ultramicroscopiques*, Paris, 1906 ; — Russo, Thèse de Lyon, 1911. — Michaelis, *Virchow's Archiv*, CLXXIX, 1905 ; — Posner, *Berliner Klin. Woch.*, 1908.

Siedentopf et *Zsigmondy*, qui examinaient des particules extrêmement fines d'or noyées dans un bloc de verre, faisaient arriver le faisceau lumineux latéralement, mais ce procédé n'est pas applicable aux préparations microscopiques qui sont très minces. *Cotton* et *Mouton* font pénétrer le rayon lumineux par-dessous et lui font traverser un bloc de verre dont les faces sont taillées de telle sorte qu'avant d'éclairer l'objet, il subisse la réflexion totale et sorte de la préparation parallèlement à la lamelle et sans entrer dans l'objectif. Le bloc de verre parallélépipédique de Cotton et Mouton a été ensuite remplacé par des condensateurs spéciaux basés absolument sur le même principe et qui prennent la place du condensateur Abbe. Les rayons lumineux traversent le condensateur, puis le liquide de la préparation où, éclairant fortement les corps en suspension, ils sont réfléchis totalement à la surface supérieure de la lamelle couvre-objet, de telle sorte qu'ils ne pénètrent pas dans l'objectif. Un écran opaque, placé au centre du condensateur, arrête les rayons directs (1).

On se sert, pour l'observation, d'objectifs à sec, faibles et forts; et aussi d'objectifs à immersion à huile ; ces derniers doivent être munis d'un diaphragme supplémentaire tubulé. L'éclairage est fourni par une source lumineuse fixe et très intense, comme la lampe Nernst ou comme les becs de gaz à manchon incandescent. La lumière solaire donne de très bons résultats. Dans quelques cas, surtout pour l'étude des suspensions et émulsions colloïdales, on emploie de préférence la lumière de l'arc électrique.

Il n'est pas nécessaire d'opérer dans une chambre noire. Le microscope, muni du condensateur spécial, est placé sur la table de travail en face de la source lumineuse. Un écran protège l'observateur contre l'éclairage direct, comme avec l'emploi ordinaire du microscope. Une lentille convergente, portée sur un pied, est placée entre le miroir et la source de lumière. On fait varier la place de la lentille et du microscope de telle sorte que le foyer soit en arrière du miroir qui se trouvera ainsi presque entièrement couvert par le faisceau lumineux. Si l'on veut obtenir un éclairage plus intense, mais sur un point plus limité, on fait en sorte que le miroir coupe le faisceau lumineux plus près du foyer.

Il est indispensable de se servir de lames et de lamelles de verre bien transparentes et absolument propres, puisque les moindres impuretés seront éclairées et pourront induire en erreur (2). Les lames doivent être d'une épaisseur déterminée, mais seulement dans le cas où le condensateur est fixe. Si le condensateur peut être déplacé dans l'axe obtenu au moyen d'une crémaillère, on l'élève ou on

(1) Il existe d'autres modèles de condensateurs à fond noir qui se placent sur la platine du microscope et sont fixés par des valets. Mais ceux qui prennent la place du condensateur Abbe, sous la platine, sont préférables, parce qu'ils restent bien centrés, peuvent être déplacés suivant l'axe optique et laissent la platine libre pour la préparation.

(2) On a recommandé le procédé suivant : on enduit la lamelle d'une couche de collodion ; on laisse sécher ; on enlève ensuite la pellicule de collodion qui entraîne les impuretés et laisse la surface très propre.

l'abaisse pour amener le foyer du faisceau lumineux exactement dans le liquide de la préparation ; on utilise dans ce cas n'importe quelle lame.

On peut observer avec cette méthode des objets montés dans le baume ou la résine dammare : mais la méthode s'applique surtout aux préparations liquides (sang frais, lymphe, plasma, sérum, etc.). Il importe que les particules éclairées ne soient pas trop rapprochées les unes des autres. Si le liquide ne peut être dilué, on l'examine en couche très mince. Si l'expérience le permet, on le dilue et on l'examine encore en couche mince, entre lame et lamelle ; on lutte les bords de la lamelle avec une paraffine dure, à point de fusion élevé.

Quand le condensateur à fond noir est placé sous la platine, le centrage se trouve réalisé par la construction du microscope, et il est en général convenable. On peut le vérifier par l'observation des anneaux de diffraction. Le condensateur étant mis en place, et complètement remonté, on dépose la préparation sur la platine en interposant une couche d'huile de cèdre entre la face supérieure du condensateur et la face inférieure de la préparation, de façon que les rayons lumineux passent du condensateur à la lame sans déviation. On règle la hauteur du condensateur en l'élevant ou en l'abaissant doucement sans rompre la couche d'huile, de telle sorte qu'avec un objectif faible, le miroir donne, au centre du champ noir, un petit cercle lumineux très brillant. Observant ensuite avec un objectif à immersion, et naturellement, en interposant une couche d'huile de cèdre entre l'objectif de la lamelle, on fixe son attention sur des points lumineux isolés qui sont nombreux dans le champ du microscope. En tournant la vis micrométrique, on obtient, par le changement de la mise au point des anneaux de diffraction : le point lumineux est entouré d'anneaux lumineux qui sont entiers et réguliers si le système optique est bien centré. Si le centrage n'est pas parfait, on modifie en conséquence l'incidence du faisceau lumineux sur le miroir.

Observation des éléments figurés du sang. — Une goutte de sang pur observée en couche très mince, de façon que les globules soient écartés les uns des autres et non superposés, peut être examinée à l'ultramicroscope et montre les éléments figurés du sang sous un aspect particulier : ils apparaissent lumineux sur un fond noir. A vrai dire, cette méthode n'a, jusqu'ici, apporté aucun renseignement nouveau sur la structure des éléments anatomiques et elle donne beaucoup moins de résultats que les méthodes histologiques (fixation et coloration). Cela se conçoit puisqu'elle ne modifie pas les relations de réfringence des différentes parties de la cellule et que certaines portions, parfaitement différenciées, peuvent être noyées dans une substance de même réfringence qu'elle. Mais la méthode est un adjuvant utile de

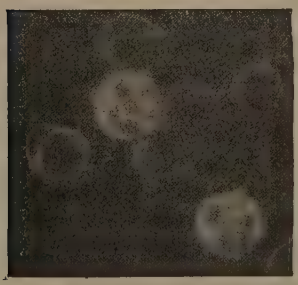


Fig. 268. — Sang d'homme. Éclairage sur fond noir. Globules rouges et polynucléaires. Photographie sans retouches de J. Comandon.

l'examen du sang frais et vivant ; certains détails de structure se voient mieux que dans le sang frais examiné à l'éclairage direct. On n'oubliera pas toutefois que la couche de sang, à l'ultra-microscope, est exposée à une lumière très intense et qu'elle est rapidement altérée par la température à laquelle elle est exposée. Au point de vue histologique, l'observation ultra-microscopique ne peut être considérée que comme une méthode de comparaison. Les hématies apparaissent sous forme de champs circulaires obscurs limités par un trait brillant. Les hématies hémolysées par l'eau distillée sont éteintes : leur contour est visible encore, mais il est mince et plus lumineux ; il s'en détache de minces filaments mobiles qui deviennent libres ; à l'intérieur de ces globules, on voit des grains brillants animés de mouvement browniens. Les filaments représentent probablement, à l'état de précipités, certaines des substances qui passent de l'intérieur du globule dans le plasma environnant, et les grains sont des précipités endoglobulaires.

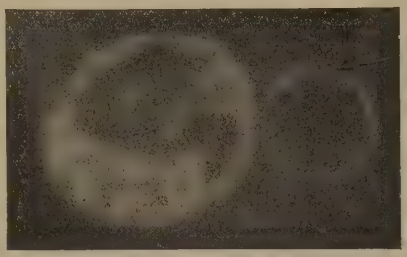


Fig. 269. — Sang d'homme. Éclairage sur fond noir. Globule rouge et leucocyte polynucléaire. Le champ sombre et arrondi situé dans la concavité du noyau correspond à la sphère. Photographie sans retouches de J. Comandon.

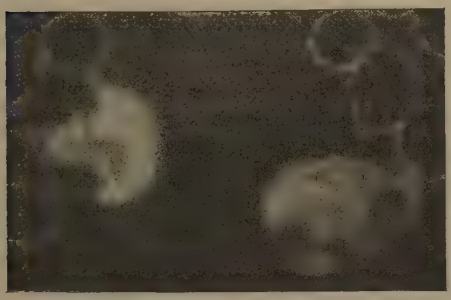


Fig. 270. — Sang d'homme. Éclairage sur fond noir. Leucocyte polynucléaire (à droite) et leucocyte éosinophile (à gauche). Remarquer la différence de réfringence des granulations dans les deux cellules. Les champs nucléaires sont noirs. Photographie sans retouches de J. Comandon.

Le cytoplasme des leucocytes apparaît lumineux à cause de sa structure granuleuse. Les grosses granulations des éosinophiles sont nettement définies et très brillantes ; on voit aussi les granulations beaucoup plus fines des polynucléaires. Ces granulations protoplasmiques sont beaucoup plus lumineuses que la chromatine, qui est peu visible ; il en résulte que le noyau apparaît comme un champ obscur dans un cytoplasme lumineux. On reconnaît fort bien dans le sang humain le noyau bilobé des éosinophiles et le noyau polymorphe des polynucléaires, alors que dans le sang frais, à

l'éclairage ordinaire, ces noyaux sont à peu près invisibles. Les lymphocytes et les mononucléaires apparaissent complètement lumineux et très finement granuleux; leur noyau est peu apparent. Les globulins sont bien visibles : ils apparaissent lumineux et homogènes, mais ils se déforment rapidement, prennent un aspect anguleux et s'aplatissent en masses nébuleuses (1).

En recevant le sang dans des tubes paraffinés et en observant les globulins dans le plasma qui surnage après sédimentation, on pourra les observer intacts un peu plus longtemps; même dans ces conditions, ils sont encore fort altérables. Il en est de même dans le plasma citraté. Mais dans les préparations du plasma paraffiné on citraté, les globulins ne s'agglutinent pas; ils restent séparés et ne forment pas de masses nébuleuses.

Observation de la coagulation. — La formation du réseau de fibrine peut être suivie à l'ultra-microscope ; les filaments de fibrine apparaissent lumineux sur un fond sombre et se distinguent beaucoup mieux qu'à l'éclairage habituel. Lorsque la précipitation de la fibrine a eu lieu, on voit dans le réseau, les amas nébuleux formés par les globulins accolés, amas qui sont en relation avec les filaments de fibrine. Mais, dans les préparations de plasma paraffiné, lorsque la fibrine se précipite, on constate l'indépendance du réseau de fibrine et des globulins.

On a cherché à suivre à l'ultra-microscope les premières phases de la précipitation de la fibrine dans le plasma (2). On y arrive en observant, non plus la coagulation du sang pur, phénomène trop rapide et trop confus, mais la coagulation lente, par les sels de calcium, du plasma fluoré. On recueille en vases paraffinés du sang de cheval qu'on reçoit sur du fluorure de sodium finement pulvérisé et on centrifuge. Ce plasma, examiné à l'ultra-microscope, apparaît presque sans granules vibrants (3). A 2 centimètres cubes de ce plasma, on ajoute une goutte d'une

(1) Aynaud et Jeantet, *in* Gilbert et Weinberg, I.

(2) A. Mayer, *S. de Biologie*, 14 décembre 1907.

(3) A. Mayer, *S. de Biologie*, 30 novembre 1907. Ce plasma est considéré comme un gel, c'est-à-dire comme une suspension colloïdale dans laquelle les granules, non résolubles, sont imbibés par le solvant, par le liquide intergranulaire, de telle sorte qu'ils forment avec lui une masse homogène. Et en effet, les déshydratants (alcool, chaleur, etc.) qui diminuent la liaison du colloïde et du solvant font apparaître dans les hydrogels des granulations microscopiques de plus en plus grosses. Plus les granules sont liés au solvant, plus la solution colloïdale est visqueuse (gelées, empois). Dans les véritables solutions colloïdales, ou sols, les granules ont peu de liaison avec le solvant; les sols montrent, à l'ultramicroscope, un grand nombre de granules animés d'un mouvement brownien. Des traces d'acides ajoutées au plasma sanguin fluoré y font apparaître un grand nombre de granulations qui grossissent et dont beaucoup s'accolent en chainettes. En additionnant de l'eau distillée à du blanc d'œuf (hydrogel optiquement homogène), on fait apparaître des granules et on transforme ainsi un hydrogel en hydrosol. Le phénomène est reversible. (Voir A. Mayer, *S. de Biologie*, 6 juillet, 20 juillet 1907 et Mayer et Schæffer, *S. de Biologie*, 11 avril 1908.)

solution décinormale de $CaCl^2$. Au bout de 4 à 5 minutes, on aperçoit dans le champ noir un très grand nombre de granules, d'une finesse extrême, qui grossissent peu à peu. Puis les granules s'accolent de façon à former des chaînettes de plus en plus longues. Dans les heures suivantes, les files de granules s'allongent encore, puis s'accolent par leurs extrémités, de façon à former un réseau extrêmement fin dont les mailles sont formées de files de granules. Lorsqu'on ajoute au plasma de plus fortes doses de sels de calcium, les granules sont beaucoup plus gros, les chaînettes sont plus courtes et se réunissent immédiatement en amas. La coagulation du lait ou du lacto-plasma, la coagulation du latex de caoutchouc (1) permettent d'observer des faits analogues : précipitation de granules qui s'ordonnent en files, les files formant ensuite un réseau. Tous ces faits tendent à nous montrer avant tout dans la coagulation un changement d'état physico-chimique de colloïdes.

Granulations ultra-microscopiques du plasma sanguin. Hémoconies. — Si on examine, à l'ultra-microscope, du sang pur entre lame et lamelle, on y aperçoit des granulations extrêmement petites, brillantes et animées de mouvements browniens. Ces granulations n'existent pas dans le plasma des individus complètement à jeun ou soumis à la diète hydrique. Elles apparaissent une à deux heures après le repas, leur nombre s'accroît et le maximum est atteint de deux à cinq heures après le repas. Elles deviennent en même temps plus volumineuses. C'est surtout après l'ingestion des graisses qu'elles apparaissent en grand nombre, alors que les repas d'épreuves privés de graisses n'exercent sur ces éléments aucune influence ou même les font disparaître du sang (2).

Leur apparition en grand nombre dans le sang paraît donc liée à l'ingestion des graisses. L'ingestion de 30 grammes de beurre chez un chien provoque l'apparition de ces granulations dans le sang au bout d'une heure ; si on empêche l'absorption des graisses de se faire dans l'intestin, en arrêtant le cours de la bile par la ligature du cholédoque, ces granulations n'apparaissent pas dans le sang (3).

Ces granulations ultra-microscopiques sont ainsi considérées par beaucoup d'auteurs comme de nature graisseuse ; leur présence en grand nombre coïncide en effet avec la présence d'un sérum lactescent. Leur proportion augmente ou diminue comme la quantité des matières grasses contenues dans le sérum sanguin (4). On les désigne

(1) V. Henri, *S. de Biologie*, 7 avril 1906.

(2) Lemierre et Brulé, *S. méd. des Hôpitaux*, 23 décembre 1910, et M. Brulé, *Recherches récentes sur les ictères*, Paris, 3e éd. 1922.

(3) Lemierre et Brulé (*l. c.*) ont fait de cette épreuve un moyen de déceler, dans les ictères, le passage ou l'arrêt du cours de la bile, le passage dans l'intestin des sels biliaires étant indispensable pour que l'absorption des graisses se produise et que les hémoconies apparaissent.

(4) Lemierre, Brulé, A. Weill et Laudat, *Presse méd.*, 7 août 1919.

généralement sous le nom d'*hémoconies* (1), mais il est probable que sous ce nom on a décrit des choses différentes : de fines granulations microscopiques, vues déjà par les anciens auteurs (*Max Schultze*, *Ranvier*, *Hayem*, etc.) et dont la préexistence dans le sang n'est pas admise par tout le monde, — des granulations de diverse grosseur dont la plupart, très fines, visibles seulement à l'ultra-microscope, et formées surtout de substances grasses — des granules colloïdaux dus à un début de précipitation. Dans le sang, même oxalaté, de pareils granules augmentent de nombre progressivement dans les préparations conservées à la glacière. Certains auteurs ont attribué une partie de ces granulations à la destruction des leucocytes ; mais c'est là une manière de voir non démontrée. Enfin, les fines granulations qui sont la cause de l'opalescence du sérum chez les malades atteints de néphrite épithéliale, paraissent être aussi de nature graisseuse.

L'ultra-microscopie constitue encore une méthode intéressante pour la recherche et l'étude des parasites du sang. Elle permet de les observer à l'état vivant d'une manière beaucoup plus nette ; c'est là un avantage particulièrement appréciable pour l'observation des parasites mobiles.

PRÉSENCE, DANS LE SANG, D'ÉLÉMENTS ANORMAUX EMPRUNTÉS A L'ORGANISME

Embolies graisseuses. — En plus des fines granulations graisseuses qui lui sont apportées par le chyle, le sang peut contenir, accidentellement, des gouttelettes de graisse; il s'agit des emboliesgraisseuses, phénomène banal dans les fractures des os longs et qui n'a pas, en général, la gravité qu'on lui a attribuée. Ces gouttelettes graisseuses absorbées par les veines médullaires ont été trouvées surtout dans les ramifications de l'artère pulmonaire où elles forment des chapelets. Elles se reconnaissent à leur aspect réfringent et à la coloration noire qu'elles prennent par l'acide osmique. Mais ces gouttelettes graisseuses n'ont jamais été observées dans le sang de la circulation générale.

(1) H. F. Müller a décrit, sous ce nom, en 1896 (*Centralblatt f. allg. Pathologie*) dans le sang des Mammifères, de fines granulations réfringentes de 1 μ de diamètre environ qui correspondent à celles qui avaient été déjà décrites par Max Schultze et Ranvier. Elles ne sont pas colorables par l'acide osmique. Elles sont distinctes des granulations ultra-microscopiques ; l'usage cependant a prévalu de désigner ces dernières sous le nom d'hémoconies (voir Cottin, Th. Paris, 1911).

Granulations pigmentaires. — Les granulations ferrugineuses du pigment ocre, si abondantes dans le foie et dans la rate dans certains états pathologiques (voir chap. IV) n'ont jamais été rencontrées dans le sang extrait des vaisseaux. Il n'en est pas de même du pigment noir du paludisme et de la mélanine des tumeurs mélaniques. Dans le paludisme aigu, l'examen microscopique du sang périphérique montre quelquefois la présence de granulations noires de 1 μ de diamètre environ, arrondies ou de forme irrégulière ; elles sont libres ou incluses dans les leucocytes. Cè pigment résiste aux acides forts et pâlit sous l'influence des alcalis. Ces granulations semblent distinctes de la mélanine des tumeurs. Bien qu'elles ne donnent pas les réactions du fer, on les considère généralement comme d'origine hémoglobique : elles seraient formées aux dépens du globule rouge par l'hématozoaire. Elles apparaissent d'abord dans les hématies au fur et à mesure que se développe le parasite. Pourtant cette origine hémoglobique n'est encore démontrée par aucune réaction. Les granulations noires libres n'apparaissent que dans les accès aigus.

Comme l'a montré *Nepveu* (1) chez les malades atteints de tumeurs mélaniques, les granulations de pigment noir peuvent apparaître dans le sang périphérique et peuvent être reconnues dans le sang retiré par piqûre du doigt. Aux autopsies, le sang de certains vaisseaux (capillaires et veines du foie) apparaît sur les coupes histologiques, rempli de granulations noires. Le pigment est libre, disséminé ou ramolli en courts cylindres ou bien il est inclus dans les leucocytes. Le passage de ces granulations dans le sang est en rapport avec la généralisation du néoplasme.

La résistance considérable des mélanines aux réactifs a empêché jusqu'ici d'obtenir, sur la nature de ces substances, des renseignements bien précis. La mélanine n'a pas les réactions du fer. Bien que quelques analyses aient indiqué la présence de minimes traces de ce métal, on s'accorde généralement à penser que le pigment noir des tumeurs n'est pas d'origine hémoglobique. Quelques auteurs ont soutenu qu'il provenait de la chromatine nucléaire ; ils auraient observé la transformation directe de bourgeons nucléaires et de particules chromatiques en mélanine. Enfin, des recherches récentes ont montré que par l'action de ferments (action de la tyrosinase sur la tyrosine), on pouvait produire des pigments noirs assez analogues aux mélanines naturelles (2).

(1) Nepveu, *S. de Biologie*, Mémoires, 1872 et 17 janvier 1874.
(2) Cf. ch. IV.

Éléments cellulaires. — Les cellules néoplasiques peuvent être observées dans le sang périphérique recueilli par piqûre. Mais les observations certaines sont fort rares ; elles concernent surtout des cas de carcinomatose. Les cellules néoplasiques se trouvent en proportion minime et de plus, elles n'ont pas toujours un aspect assez caractéristique pour être distinguées nettement des leucocytes. On a proposé de recueillir le sang dans un liquide capable d'hémolyser les globules rouges et de conserver en même temps les cellules (solution d'acide acétique à 1 p. 100, alcool au tiers de Ranvier) de centrifuger et de passer en revue les préparations faites avec le sédiment. Malgré ces précautions, la recherche est presque toujours négative ; les faits positifs n'ont pas été confirmés et la méthode n'a guère d'application clinique.

Il est très vraisemblable que déjà à l'état physiologique, les cellules endothéliales vasculaires peuvent devenir libres dans le sang circulant. Ce que nous avons dit des transformations des cellules endothéliales irritées rend cette hypothèse plausible. L'apparition fréquente, dans les sinus des ganglions lymphatiques, de grosses cellules ayant manifestement une origine endothéliale, est encore en faveur de cette supposition. Il est donc très possible qu'un certain nombre des grands mononucléaires du sang correspondent à des cellules endothéliales vasculaires, sanguines et surtout lymphatiques (1).

Chez des femmes mortes au cours de la grossesse, particulièrement chez des éclamptiques, ou chez des femmes mortes des suites d'une grossesse tubaire, l'examen histologique des poumons a permis quelquefois d'y découvrir des embolies formées par des cellules provenant du revêtement épithélial des villosités placentaires (2). Comme ces villosités nagent dans le sang maternel, le fait est compréhensible et peut être expliqué par l'action de contractions utérines violentes ou de manipulations brutales lors d'une délivrance artificielle (3). Il faut rapprocher de ces faits les observations qui ont montré, chez certains malades, la présence de mégacaryocytes dans les petits vaisseaux pulmonaires. On a attribué leur présence à des embolies parties de la moelle osseuse ; mais c'est là une interpréta-

(1) Quant à considérer, comme certains auteurs, que la plupart des cellules lymphoïdes du sang sont d'origine endothéliale, c'est là une exagération manifeste qui ne repose sur aucun fait précis.

(2) Schmorl, *Centralblat. f. allgem. Pathologie*, XV, 1904 ;
Hitschmann, *Zeitschrift f. Geb. und Gynækologie*, LIII, 1904.

(3) Le syncytium chorial peut normalement émettre des bourgeons qui deviennent des plasmodies libres dans le sang des espaces sanguins maternels (voir ch. XVIII).

tion qui n'est pas encore certaine. Dans le sang retiré du doigt, pendant la vie, les mégacaryocytes, pas plus que les éléments du syncytium placentaire n'ont presque jamais été observés (1).

On ne peut signaler que comme une curiosité pathologique, les embolies tissulaires anormales et exceptionnelles décrites par *Charrin* et *Levaditi* (2) dans le poumon et concernant des fibres musculaires striées. On peut admettre que dans un phlegmon, de minuscules fragments nécrosés contenant encore des fibres élastiques et des fibres musculaires striées, reconnaissables, puissent être absorbées par une veine et lancées dans le cœur et dans le poumon.

La pénétration accidentelle dans le sang, de cellules étrangères à ce liquide, en particulier dans la grossesse, dans le cancer, a permis de supposer que le sang, pour les transformer et les faire disparaître, fabriquait des diastases particulières, *diastases de défense*, spécifiques. La recherche, *in vitro*, de ces réactions diastasiques du sérum, ainsi provoquées (vis-à-vis des fragments de placenta dans la grossesse, vis-à-vis de tissu cancéreux dans le cancer, etc.) a été appliquée au diagnostic clinique. Bien que ces réactions, pour la grossesse surtout (*Abderhalden*) aient déjà donné des résultats intéressants, la méthode ne peut être encore exactement jugée (3). En injectant dans la cavité péritonéale d'un animal des fragments d'un organe déterminé (rein, cerveau, etc.), on a cherché à faire ainsi apparaître dans le sang des diastases de défense. Mais la spécificité des propriétés nouvelles ainsi apparue est toute relative.

(1) Voir ch. XVII. Pour GUIEYSSE (*S. de Biologie*, 15 octobre 1921), les mégacaryocytes trouvés dans le poumon seraient formés sur place.
(2) CHARRIN et LEVADITI, *J. de Physiologie et de Path. gén.*, 1899.
(3) Voir LAMBLING, *Précis de Biochimie*, 3e éd., 1921, et ch. IX.

CHAPITRE IX

HÉMOLYSE. RÉSISTANCE DES GLOBULES ROUGES PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DES SÉRUMS

L'action de l'eau distillée sur le sang produit presque instantanément la disparition des globules rouges par diffusion de leur hémoglobine. C'est à ce phénomène qu'on a donné le nom d'*hémolyse* (1). L'addition à l'eau distillée, en certaines proportions déterminées, de sels comme le chlorure de sodium ou le sulfate de soude, empêche le phénomène de se produire ; mais certaines substances, ajoutées, même en petite quantité à ce milieu salin conservateur, produisent la diffusion du pigment sanguin. Ce sont les substances hémolysantes ou hémolytiques.

L'hémoglobine étant d'une couleur rouge vif et soluble dans l'eau, sa diffusion hors du globule a pu servir d'indice, de témoin apparent pour un grand nombre de réactions. Le phénomène de l'hémolyse concerne l'étude histologique et physiologique du globule rouge ; il se trouve relié à des problèmes fondamentaux de physico-chimie et de pathologie ; il est devenu le réactif le plus précis des recherches sur l'immunité.

Le phénomène de la disparition des globules rouges dans l'eau distillée et de la diffusion de l'hémoglobine a été connu de bonne heure par les observateurs au microscope (2).

(1) L'usage a donné au terme d'*hémolyse* le sens de dissolution apparente des hématies par diffusion de l'hémoglobine. En réalité, le plus souvent, les stromas ne sont pas dissous. On distinguera donc différentes variétés d'hémolyse allant de la diffusion simple du pigment jusqu'à la dissolution complète de l'hématie.

(2) La nécessité d'obtenir de bons milieux conservateurs pour diluer le sang destiné à la numération des hématies a été le point de départ des premières recherches méthodiques faites à ce sujet. En 1872, *Malassez*, cherchant un bon liquide de dilution pour la numération des globules rouges, s'adressa aux solutions salines de chlorure de sodium

Depuis longtemps, les histologistes employaient comme liquide « indifférent », c'est-à-dire conservateur pour les éléments anatomiques, l'eau salée à 0,75 p. 100. Cette solution servait de milieu de dissection ou de dissociation pour la préparation des pièces anatomiques non encore fixées et qu'on désirait ménager. On se figurait, d'après certaines observations microscopiques, comme celle des mouvements des cils vibratiles, comme la conservation de la couleur des globules rouges, que ce liquide n'altérait pas la vitalité des tissus. Aussi appelait-on la solution de chlorure de sodium à 0,75 p. 100 « solution physiologique » ; on la considérait comme un « sérum artificiel » capable de remplacer le sérum sanguin et ce fut à elle qu'on s'adressa en effet pour remplacer, chez l'homme, la transfusion du sang, momentanément abandonnée à la suite de graves mécomptes.

En étudiant, *in vitro*, au microscope, l'action de ce liquide sur les globules rouges de l'homme et du lapin, *Malassez* vit que beaucoup d'hématies, surtout chez le lapin, se gonflaient, devenaient sphériques en diminuant de diamètre, ou prenaient la forme de sphères épineuses. Si au lieu d'utiliser la solution à 0,75 p. 100, on étudiait ce qui se passait dans les solutions plus concentrées, on constatait que dans les solutions légèrement supérieures à ce titre, ce gonflement ne se produisait plus et que dans les solutions très concentrées, à 5 et à 10 p. 100, les hématies s'aplatissaient et devenaient lamelliformes en augmentant de diamètre.

Ces phénomènes peuvent être expliqués très simplement par les lois de l'osmose (1). Si on compare le globule rouge à une vessie creuse, limitée par une membrane perméable à l'eau et non aux sels, ce qu'en physico-chimie, on appelle une membrane semi-perméable, on comprendra que dans l'eau distillée ou dans les solutions salines faibles, le globule, plus riche en sels que le milieu dans lequel il se trouve, attire de l'eau, gonfle, devienne sphérique, et apparaisse plus petit au microscope. Dans les solutions fortes, au contraire, l'hématie, moins riche en sel que le milieu environnant, perd de l'eau, s'aplatit comme une vessie vide et son diamètre paraît plus grand au microscope.

L'hémolyse est considérée ainsi comme une simple conséquence du gonflement, par rupture de la membrane ou dilatation de ses pores. En examinant au microscope, l'action des solutions salées de

et de sulfate de soude. Il vit que ces solutions conservaient les hématies à des concentrations déterminées qui variaient suivant la substance employée et suivant l'espèce animale.

(1) Voir Dastre, *Osmose*, in *Traité de Physique biologique* de d'Arsonval, Chauveau, Gariel, Marey et Weiss, Paris, 1901, I, p. 466 ; — Bottazzi, *Ergebn. der Phys.*, VII, 1908.

concentrations sériées, *Malassez* arrive à conclure que, pour le sang des Mammifères tout au moins, la solution de chlorure de sodium à 1 p. 100 conserve mieux la forme et les dimensions des globules rouges que la solution à 0,75 p. 100 (1).

Mais l'examen morphologique des hématies n'était pas susceptible d'une précision et d'une constance suffisante pour l'étude de ces phénomènes, et nous savons déjà pourquoi (chap. II) : c'est que les variations de forme et même de volume des hématies dans les solutions salines ne sont pas exactement fonction du titre de la solution. Elles sont distinctes de la sortie de l'hémoglobine ; elles sont assez délicates à apprécier. La diffusion de l'hémoglobine, qui se manifeste par la coloration vive du liquide de suspension, est un phénomène beaucoup plus frappant et qui peut être soumis à des mesures beaucoup plus précises. C'est sur ce phénomène que dans ses recherches s'était basé *Hamburger* (2) quand il avait étudié l'action des solutions salines altérantes ou conservatrices des globules rouges.

L'hémoglobine diffusait dans l'eau distillée ; elle était complètement conservée dans la solution de NaCl à 0,75 p. 100. Il fallait savoir exactement dans quelle solution commençait l'hémolyse et à partir de quelle concentration tous les globules étaient conservés. A cette fin, *Hamburger* prépare un certain nombre de tubes contenant des solutions de chlorure de sodium de concentration régulièrement croissante et allant de 0,30 à 0,70 p. 100 par exemple. A chaque tube, il ajoute une même quantité du sang à essayer. Après un temps déterminé, il observe ceci : dans les solutions les plus faibles, le liquide est rouge, il n'y a aucun dépôt d'hématie, toute l'hémoglobine paraît avoir diffusé. Vers 0,40, par exemple, on commence à remarquer un petit dépôt de globules ; en allant de cette solution vers les solutions plus fortes, le liquide est de moins en moins coloré par l'hémoglobine et le dépôt d'hématies de plus en plus abondant. Le titre de la solution dont le liquide est parfaitement clair, dans laquelle par conséquent, il n'y a pas d'hémoglobine dissoute, est, chez l'homme, voisin de 0,48 p. 100.

En employant d'autres sels que le chlorure de sodium, par exemple, le sulfate de magnésie, le sulfate de soude, le sulfate de potasse, l'azotate de potasse, etc., on obtient des phénomènes semblables ;

(1) Malassez, *C. R. de la S. de Biologie*, 5 janvier 1889, 16 et 23 mai 1896 ; *Cours du Collège de France*, 1893.

(2) Hamburger, *Rapport au XIIIe Congrès int. méd.*, Paris, 1900, *C. R. Section d'An. pathol.*, p. 324 ; *J. de Physiologie et de Path. gén.*, 1900 ; *Osmotischer Druck und Ionenlehre*, Wiesbaden, 1902 ; *Archiv f. An. u. Phys. Phys. Abth.*, 1897.

le titre de la solution-limite est constant, précis pour un sel déterminé ; il varie avec le sel. Avec le même sang, et toutes conditions égales d'ailleurs (température, volumes mis en présence, etc.), elle sera par exemple de 0,60 p. 100 avec le chlorure de sodium, de 1,16 p. 100 avec le sulfate de potasse, de 3,52 p. 100 avec le sulfate de magnésie, etc. Ces solutions de sels différents, de concentration différente, mais ayant le même effet, possédant le même pouvoir conservateur sur les globules rouges, sont dites *isotoniques*.

Hamburger constatait, au moyen de cette méthode, tout un ensemble de faits : si on variait l'espèce animale qui fournissait le sang, il fallait, pour un sel donné, varier également le titre de la solution. Si par exemple, avec le sang de bœuf, il fallait employer une solution d'azotate de potasse à 1 p. 100, avec le sang d'oiseau, il fallait une solution à 0,7, avec le sang de poisson, une solution à 0,6, avec le sang de grenouille, une solution à 0,3, le titre de la solution diminuant toujours si on passait des Mammifères aux Vertébrés à température variable. Chacune de ces solutions correspondait pour chaque espèce, à la tension-limite que les hématies étaient capables de supporter, sans perdre leur hémoglobine (1).

Les recherches de *Hamburger* sur l'hémolyse des globules rouges avaient été précédées de celles de *Traube* et *de Vries* qui, en employant une méthode différente et en s'adressant à des cellules végétales, étaient arrivés à des résultats de même ordre. On connaît ce phénomène banal : une tige fanée placée dans l'eau pure, absorbe de l'eau et devient turgide ; placée dans l'eau salée forte, elle perd de l'eau et se fane davantage. Bien qu'il s'ajoute ici des phénomènes de capillarité et d'imbibition, le fait ressemble à celui de l'expérience fondamentale d'osmose que nous citions tout à l'heure. On peut faire l'expérience en prenant des fragments de tige et en regardant au microscope ce qui se passe dans les cellules de la plante. *De Vries* prend des fragments minces de la nervure médiane d'une feuille de *Tradescantia*. Les cellules végétales y sont représentées chacune par une masse protoplasmique qui remplit exactement une petite loge

(1) *Hédin* (voir ch. III) avait mesuré le volume du sédiment sanguin obtenu par centrifugation, c'est-à-dire le *volume globulaire*. *Hamburger* applique cette méthode à l'étude de la pression osmotique. Il mesure le volume du sédiment obtenu avec une quantité déterminée d'un même échantillon de sang mélangé à des solutions salines diverses, de concentration différente, dans les limites où l'hémolyse ne se produit pas. Il arriva au résultat suivant : avec des solutions salines de sels différents, mais isotoniques, le volume globulaire est constant. Pour un même sel, le volume est inversement proportionnel à la concentration de la solution ; autrement dit : plus la solution est diluée, plus le volume augmente (Hamburger, *Centralblatt, f. Physiologie*, 1893 et Koeppe, *Archiv f. d. ges. Phys.*, 1897).

polyédrique limitée par des parois de cellulose. A l'état normal, cette masse protoplasmique vivante est exactement appliquée contre la membrane de cellulose, mais elle n'y adhère pas. Le protoplasma contient des sels et du sucre, substances qui ont la propriété d'absorber de l'eau. Mais si l'on place ce fragment dans de l'eau salée dont on élève progressivement la concentration, il arrive un moment où l'on voit la masse protoplasmique se rétracter et se détacher de la paroi cellulosique. C'est à ce phénomène qu'on a donné le nom de *plasmolyse*.

Il est facile de comprendre ce qui s'est passé ici : on peut supposer que la masse protoplasmique est limitée par une paroi semi-perméable, perméable à l'eau, imperméable aux sels. Si la solution salée environnante est de concentration suffisante, l'eau de la cellule sera attirée vers la solution et la cellule perdra de son eau ; elle se ratatinera et se détachera de la paroi de cellulose. Comme dans l'expérience d'osmose, il y aura un courant d'eau allant du point où la pression osmotique est la moins élevée (le suc protoplasmique) vers l'endroit où la pression est plus forte (la solution salée environnante). La pression osmotique du suc protoplasmique est due aux sels, aux sucres et aux diverses substances qu'il contient en solution ; elle est assez fixe ; en élevant la concentration du milieu extérieur salé, il arrivera toujours un moment où la pression osmotique du milieu sera plus forte, la cellule perdra alors une partie de son eau et subira une rétraction. C'est le moment où se produit la *plasmolyse*, indice visible au microscope, qu'on prend comme point de repère. Lorsque le phénomène commence à être observé sur un certain nombre des cellules du fragment de tige immergé, on admet qu'il y a équilibre osmotique entre le suc protoplasmique et le liquide salé. A ce moment, le suc protoplasmique et la solution sont dits isotoniques.

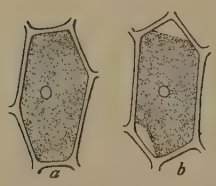


Fig. 271. — *Tradescantia discolor*. — Cellules de l'épiderme de nervure de feuille.
a, cellule normale ; — *b*, cellule au début de la plasmolyse. D'après de Vries.

Si la cellule plasmolysée est replongée dans l'eau pure, il se produit un courant d'eau inverse qui va de l'eau extérieure vers la cellule : la masse protoplasmique se gonfle, reprend sa turgescence normale qui n'est arrêtée que par la limite que lui oppose la paroi de cellulose.

Le résultat des expériences de *de Vries* est très net : pour une même espèce cellulaire et pour un sel donné, toutes autres conditions égales, la plasmolyse se produit à un titre de concentration déterminé et constant. Pour des sels de constitution chimique voisine, chlorure

de sodium, chlorure de potassium, bromure de potassium, iodure de sodium, etc., deux solutions de sels différents qui produisent la plasmolyse sont dites *isotoniques* (1).

Par la plasmolyse, on peut ainsi obtenir des solutions dont le *pouvoir osmotique* est égal (2).

Ayant trouvé, par l'étude de la plasmolyse, un certain nombre de solutions isotoniques de sels différents mais de constitution chimique voisine, *de Vries* remarqua que ces solutions renfermaient des quantités de sels proportionnelles à leur *poids moléculaire*. Autrement dit, elles sont *équimoléculaires*, elles ont même *concentration moléculaire*, elles renferment le même nombre de molécules.

Les propriétés de ces solutions sont en effet, avant tout, des propriétés *physiques*, qui dépendent de leur concentration et non de leur action chimique, c'est-à-dire qu'elles ne résultent pas des combinaisons nouvelles qui peuvent être formées par leur action, entre elles et la substance vivante, mais du nombre des molécules contenues dans un même volume de la solution.

Si par exemple, nous faisons deux solutions aqueuses de corps différents ($NaCl$, $CaCl^2$) et si dans chacune de ces deux solutions nous mettons, pour une même quantité d'eau, un poids de sel correspondant à son poids moléculaire, ces deux solutions contiendront le même nombre de molécules. Elles sont dites *équimoléculaires ;* elles ont même *concentration moléculaire* (3).

On peut donc déterminer, pour certains corps, par la connaissance de leur constitution chimique et de leur poids moléculaire, les solutions qui auront la même tension osmotique et qui seront isotoniques, la pression osmotique d'une solution étant proportionnelle à la concentration moléculaire de cette solution.

Pression osmotique. Cryoscopie. Isotonie du sérum sanguin. — Les travaux de *Vant'Hoff* ont montré les analogies très grandes qui existent entre les gaz et les dissolutions. Les molécules du corps dissous se meuvent au sein du dissolvant comme les molécules d'un gaz se meuvent dans l'éther. Un gaz

(1) De Vries, *Zeitschrift f. physik. Chemie*, 1889.

(2) Il est intéressant de constater en passant que le phénomène osmotique se produit ici dans un protoplasma nu ; le courant d'eau se fait à travers une *membrane plasmatique* constituée par la couche limitante du protoplasme de la cellule végétale ; c'est elle et non la membrane de cellulose qui joue le rôle de paroi semi-perméable. La loge de cellulose, inextensible, ne sert que de témoin permettant d'apprécier d'une manière très évidente l'état de turgescence ou de contraction de la masse protoplasmique qu'elle renferme.

(3) Ainsi, une solution contenant 58,5 p. 1.000 de $NaCl$ et une solution contenant 111 gr. p. 1.000 de $CaCl^2$ seront équimoléculaires. La solution qui contient 1 molécule-gramme pour 1.000 est appelée solution normale et la solution qui contient 1/10 molécule-gramme pour 1.000 est appelée solution décinormale.

exerce une pression sur les parois du vase qui le renferme. De la même manière, le corps dissous exerce une pression sur les parois du vase qui contient la solution : cette pression est la *pression osmotique*. Dans les conditions ordinaires, elle est masquée par la pression en sens contraire qui maintient les molécules du liquide en une seule masse ; mais on peut la constater dans les expériences d'osmose. Si en effet, comme l'a fait *Pfeffer*, on introduit une solution épaisse de sucre ou de sel dans un tube de verre fermé à sa partie inférieure par une membrane semi-perméable (parchemin ou paroi poreuse imprégnée de ferrocyanure de cuivre) et si, plongeant ce tube ainsi rempli dans l'eau pure, on amène les niveaux des deux liquides au même point, le liquide s'élève dans le tube. La pression mesurée par la hauteur de la colonne liquide dans le tube, au-dessus du niveau extérieur, représente exactement la *pression osmotique* exercée par les molécules de sucre ou de sel ; c'est la pression qu'il aurait fallu exercer sur la surface libre de la solution pour empêcher le liquide de s'élever dans le tube.

Les travaux de *Pfeffer*, de *Vant'Hoff*, de *Raoult*, ont permis d'assimiler complètement la pression osmotique des corps dissous à la pression des gaz. Les molécules dissoutes exercent exactement la même pression qu'elles développeraient si on les gazéifiait dans le même espace. De même que 2 gr. d'hydrogène, 32 gr. d'oxygène, 76 gr. de chlore, ou d'une manière générale une molécule-gramme d'un gaz quelconque, occupant le volume de 1 litre, exerce, à 0°, une pression de 22 atmosphères 35, de même, une molécule-gramme de sucre de canne, 260 gr. de glucose, exercent, à la même température, dans un litre de solution, une pression osmotique de 22 atmosphères 35.

Les lois des gaz de Mariotte, de Gay-Lussac, d'Avogrado, sont, en effet, applicables aux corps en dissolution en remplaçant la pression gazeuse par la pression osmotique (1). Ce sont *les lois osmotiques* de *Vant'Hoff* (2.)

Enfin, on a pu démontrer l'existence de relations étroites entre la pression osmotique et l'abaissement du point de congélation des solutions. Les abaissements et élévations que présentent les points de congélation et les points d'ébullition des solutions seront directement proportionnels à la pression osmotique des solutions et, par conséquent au nombre des molécules qu'elles contiennent; les solutions contenant le même nombre de molécules présentent les mêmes abaissements et les mêmes élévations.

En 1788, *Blagden* avait vu, en effet, que si on ajoute un peu de sel de cuisine ou du sucre à de l'eau, le point de congélation de cette solution était plus bas de quelques dixièmes de degré que le point de congélation de l'eau. Il avait vu, de plus, que le point de congélation était abaissé d'une grandeur proportionnelle à la quantité de sel ajouté. En 1880, *Raoult*, reprenant ces expériences, montra leurs relations avec le phénomène dont nous nous occupons et en fit une méthode générale, la *cryoscopie* (3).

(1) Vant'Hoff, *Revue gén. des Sc.*, 1893.

(2) Pour une même masse de molécules dissoutes, la pression osmotique est proportionnelle à la concentration (*Mariotte*) ; elle est proportionnelle à la température absolue (*Gay-Lussac*) ; elle est indépendante de la nature du dissolvant et de la nature du corps dissous (*Vant'Hoff*). Un même volume d'une dissolution quelconque, à la même température et à la même pression osmotique, contient le même nombre de molécules (*Avogrado*).

(3) Raoult, *Annales de Chimie et de Physique* et *C. R. Académie des Sciences*, 1880-1896 ; *Congrès de l'Association pour l'Avenir des Sciences*, Grenoble, 1885 ; *Cryoscopie*, collection Scientia; *Tonométrie*, collection Scientia; — Bousquet, Thèse Paris, 1899 ; — Asher, in *Handbuch der phys. methodik* de Abderhalden ; — Dastre, in *Traité de Physique*

Si l'on prend par exemple, le chlorure de sodium, et qu'on étudie le point de congélation de solutions de titres croissants et de proportions simples, on constate, comme l'avait vu *Blagden*, que l'abaissement du point de congélation est proportionnel à la concentration de la solution, c'est-à-dire au poids de sel dissous dans un même volume d'eau. Ainsi, par exemple :

Une solution NaCl à $\frac{1}{100}$ congèle à : — 0°,585 ; l'abaissement (ou Δ) est de 0,585 ;

Une solution NaCl à $\frac{2}{100}$ congèle à — 1°,17 ; l'abaissement est *double*.

Une solution NaCl à $\frac{3}{100}$ congèle à — 2°,34 ; l'abaissement est *triple*.

C'est ce qu'on nomme *la loi de Blagden* (1).

Si, au lieu de prendre du chlorure de sodium, on s'adresse à un autre sel (azotate de potasse, iodure de potassium ou de sodium etc.), on observe les mêmes faits ; seulement la quantité de sel qu'il faudra ajouter à l'eau pour obtenir le même abaissement du point de congélation ne sera plus la même. Mais le degré de cet abaissement (dans certaines limites qui ne dépassent pas l'ordre de nos recherches), sera toujours proportionnel à la concentration moléculaire de la solution, c'est-à-dire au nombre de molécules contenues dans 100 grammes de solution (2).

Si nous prenons, par exemple, une solution de sucre de canne à 1 p. 100, l'abaissement du point de congélation (ou Δ) sera de 0,054 ; avec une solution de glucose à 1 p. 100, l'abaissement sera de 0,103. Mais si, tenant compte des considérations précédentes, nous faisons deux solutions équimoléculaires, contenant chacune une molécule-gramme pour 100 gr., nous aurons une solution de sucre de canne à $\frac{342}{100}$ gr. ou une solution de glucose à $\frac{180}{100}$ gr., c'est-à-dire des solutions dont la

biologique, de D'ARSONVAL, CHAUVEAU, GARIEL, MAREY et WEISS ; — WINTER, *Archives de Physiologie*, XXVIII, 1896 ; — NOLF, *Revue générale des Sciences*, 1901 ; — MULON, Thèse Paris, 1901.

(1) La loi de *Blagden* n'est vraie que dans certaines limites de concentration, et pour des dissolutions suffisamment étendues. De plus, elle présente de nombreuses exceptions, pour les solutions des acides forts, des bases fortes et des sels, conductrices de l'électricité et qui en réalité, ne sont pas de véritables solutions, parce qu'elles sont plus ou moins dissociées en ions ; et c'est justement sur ces exceptions qu'est, en partie, basée la théorie des ions. Les solutions de substances organiques, les solutions sucrées, en particulier, employées par *Raoult* sont, au contraire, des solutions véritables, dans lesquelles la diffusion n'est pas compliquée de phénomènes de dissociation, et la loi de *Blagden* se vérifie. Pour des raisons de même ordre et parce que ce ne sont pas de vraies solutions, mais des émulsions dans lesquelles molécules et ions sont diversement agglutinés, les solutions colloïdales présentent de nombreuses exceptions. *Arrhenius* a cherché à ramener à la loi générale les exceptions présentées par des solutions salines en tenant compte des molécules dissociées. L'abaissement du point de congélation est alors proportionnel au nombre de molécules actives contenues dans 100 grammes de solution, en entendant par molécules les molécules chimiques et les molécules électrolytiques (ions). On considère ainsi que chacun des ions dissociés se comporte, au point de vue cryoscopique, comme une molécule dissoute. Pour les solutions de NaCl, si importantes dans les études biologiques, il se trouve qu'entre des limites assez étendues, elles se comportent comme des solutions véritables de corps non électrolytiques : elles suivent assez exactement la loi de *Blagden*.

(2) L'action exercée par la substance dissoute sur la congélation est ainsi une fonction moléculaire. L'abaissement du point de congélation est un phénomène absolument général qui s'observe avec tous les dissolvants et même lorsqu'on emploie comme dissolvant un corps en fusion.

concentration est proportionnelle aux poids moléculaires des corps en présence. Or, nous trouvons : pour le sucre de canne : $\Delta = 18,5$; et pour le glucose : $\Delta = 18,5$.

Ces deux solutions, contenant une molécule-gramme pour 100, ont même abaissement du point de congélation et sont isotoniques. La cryoscopie, en déterminant le point de congélation de solutions salines, peut de la même façon, nous servira à trouver les solutions ayant même pression osmotique et capables d'avoir les mêmes effets sur les globules rouges ou les cellules végétales (1).

Si, en effet, on soumet à l'examen cryoscopique deux solutions salines qui ont été trouvées isotoniques par la plasmolyse, on constate que ces deux solutions produisent ainsi le même abaissement du point de congélation. Ainsi, deux solutions qui produisent la plasmolyse, qui sont isotoniques, ont le même point de congélation et ont aussi même concentration moléculaire, même nombre de molécules. La pression osmotique, la capacité de produire le plasmolyse, l'abaissement du point de congélation, sont des propriétés physiques dépendant de la concentration du liquide en molécules ; elles marchent de pair ; elles sont dites *colligatives*.

L'appareil dont on se sert pour déterminer le point de congélation consiste essentiellement dans un vase de verre contenant un mélange refrigérant (de glace pilée et de sel le plus souvent), et dans une éprouvette destinée à recevoir le liquide dont le point de congélation doit être déterminé. Dans le liquide, on introduit un thermomètre à longue tige dont la graduation a été déterminée avec soin et dont les degrés situés au-dessous du zéro présentent de nombreuses divisions permettant de faire des déterminations à 1 centième de degré près. On laisse la température s'abaisser jusqu'à une limite un peu inférieure à celle du point de congélation supposé, de telle façon que le liquide à déterminer se trouve dans un état de surfusion ; on provoque la gélification en ajoutant un petit cristal du sel en dissolution. Il se produit des oscillations du niveau du mercure qui tiennent à ce que ce qui se congèle, c'est l'eau, la solidification étant le résultat d'une série de solidifications successives. On note le moment où le mercure paraît en équilibre ; c'est le début de la solidification qui est pris comme point de congélation.

La méthode de la cryoscopie permet ainsi de trouver expérimentalement, par l'abaissement du point de congélation, des solutions isotoniques dont les effets physiques sur la cellule végétale et sur les globules rouges seront les mêmes. Mais c'est surtout quand il s'agit de solutions complexes ou de liquides organiques qu'elle est précieuse. Pour des solutions simples, le calcul permet à la rigueur d'établir des solutions équimoléculaires ; pour des mélanges, la chose devient déjà un peu plus compliquée ; elle devient impossible pour les liquides organiques complexes.

Lorsqu'il s'agit de trouver un liquide salin conservateur des globules rouges, on sera tout de suite porté à rechercher les propriétés osmotiques du plasma ou du sérum, et à établir une solution isotonique avec ce milieu naturel de suspension. La cryoscopie donnera très facilement le résultat par l'abaissement du point de congélation. Chez l'homme, le point de congélation du sérum sanguin est voisin de 0,56. Des solutions salées ayant même point de congélation, ou plus exacte-

(1) L'abaissement du point de congélation peut être exprimé de plusieurs façons. On l'exprime le plus souvent par l'*abaissement moléculaire*, c'est-à-dire par l'abaissement produit par 1 molécule du corps dissous dans 100 grammes du dissolvant.

ment, même abaissement du point de congélation de 0,56, auront même pression osmotique et seront isotoniques avec le sérum sanguin, ce qui pour le chlorure de sodium, correspond à une solution à 0,93 p. 100.

On a cru pendant quelque temps que les différentes humeurs de l'organisme, pour une espèce déterminée, avaient le même point de congélation et surtout que le point de congélation du sérum sanguin était constant. On sait aujourd'hui qu'il n'en est rien. Non seulement le point de congélation du sérum sanguin varie suivant les espèces, mais, dans une même espèce, il peut varier suivant les conditions physiologiques. Chez l'homme, les variations physiologiques et surtout les variations pathologiques peuvent s'étendre entre des limites assez grandes (0,49 à 1,04 correspondant à des solutions de chlorure de sodium variant de 0,8 à 1,7 p. 100). La solution dite physiologique à 0,75 p. 100, employée d'abord pour les injections intraveineuses, est donc le plus souvent inférieure, chez les Mammifères et chez l'homme, à la concentration moléculaire du sérum sanguin.

L'isotonie moyenne du sérum de l'homme correspond à des solutions de chlorure de sodium à 0,93 (*Hamburger*, *Hedin*, *Malassez*, *Winter*, *Bousquet*). On fut amené ainsi, pour les injections salées intraveineuses ou sous-cutanées, à préconiser une solution à 0,90 donnant par concentration à l'autoclave environ 1 p. 100. Plus tard, on abaissa un peu ce titre, parce qu'on voulut tenir compte, non seulement des propriétés osmotiques du plasma, mais aussi de sa composition saline (5 à 6 p. 1.000 NaCl).

Différentes variétés d'hémolyse. — A côté des solutions salées ou sucrées qui ne produisent l'hémolyse qu'à des concentrations trop faibles, il existe d'autres substances qui laissent diffuser l'hémoglobine, quelle que soit la concentration de leur solution. Parmi ces substances, l'urée a été souvent étudiée. Elle produit l'hémolyse à toute concentration. Mais si à une solution d'urée on ajoute 0,9 p. 100 de chlorure de sodium, de façon à réaliser une solution isotonique avec le sérum sanguin, les globules rouges ajoutés à ce mélange sont conservés (1).

On peut remplacer le chlorure de sodium par d'autres sels et les globules rouges ajoutés seront encore conservés si la concentration moléculaire de la solution reste la même. Il ne s'agit pas là d'une action neutralisante, mais d'un phénomène analogue à celui que l'on produirait si on ajoutait à la solution salée isotonique, au lieu d'urée, un peu d'eau distillée. Si, en effet, on répète l'expérience en faisant des solutions salines de concentration décroissante, contenant chacune la même quantité d'urée, et auxquelles on ajoute la même quantité d'un échantillon de sang, l'hémolyse commencera dans la solution-limite, exactement comme dans l'expérience témoin, dans laquelle

(1) Gryns, *Archiv f. d. ges. Physiologie*, LXIII, 1896. D'une manière générale, les solutions qui produisent l'hémolyse tuent aussi les leucocytes, mais sans les détruire toujours, et les solutions isotoniques sont nécessaires pour la conservation des globules blancs (voir ch. v).

l'urée n'a pas été ajoutée. L'urée agit donc, au moins en apparence, exactement comme l'eau distillée. Comme elle, en effet, elle pénètre rapidement les globules.

D'autres substances provoquent au contraire l'hémolyse, même à doses faibles, en milieu salin isotonique ; tels sont par exemple les sels biliaires. Si à une suspension de globules rouges dans l'eau salée isotonique, nous ajoutons une petite quantité de bile, nous provoquerons une hémolyse rapide et énergique, et si la proportion de bile ajoutée est assez grande, les stromas seront même dissous. On a voulu voir quelquefois dans cette action hémolytique un phénomène tout à fait différent de l'hémolyse par l'urée et on a réservé le plus souvent le nom de substances hémolytiques ou hémolysines aux substances qui provoquent la diffusion de l'hémoglobine en milieu isotonique (1).

Enfin, il est toute une catégorie de substances qui provoquent encore, et souvent très énergiquement la diffusion de l'hémoglobine en milieu isotonique : ce sont les toxines et les sérums. Les hémolysines contenues dans les venins, dans les toxines et dans les sérums sont remarquables par ce fait très intéressant : c'est que l'organisme peut être vacciné contre leur action et qu'on peut aussi provoquer *in vivo* la formation de ces hémolysines. Certains sérums ont des propriétés hémolytiques naturelles, spontanées ; d'autres, inoffensifs, peuvent être rendus nocifs vis-à-vis de certains globules rouges par injection de ces globules. On observe des réactions analogues dans l'étude de l'immunisation de l'organisme vis-à-vis des microbes, des poisons et des toxines. L'hémolyse par les sérums est donc une question qui se rattache étroitement à celle de l'immunité.

Nous apercevons ainsi, dans l'étude de l'hémolyse, trois groupes de faits : 1° l'hémolyse par l'eau distillée et par les solutions salines hypotoniques, faits dans lesquels la pression osmotique, au moins en apparence, paraît jouer le rôle le plus important ; 2° l'hémolyse par les substances chimiques définies, catégorie qui renferme des faits certainement très disparates, mais ayant ce point commun, c'est que les substances qui en sont la cause sont déterminées chimiquement, ce qui constitue des conditions favorables pour l'étude des phénomènes ; 3° l'hémolyse par les sérums, catégorie de faits très étudiés au point de vue biologique, très importants au point de vue de l'im-

(1) Cette distinction n'est pas absolue, mais elle est pratiquement utile. Un grand nombre de substances chimiques définies provoquent la diffusion de l'hémoglobine en milieu isotonique.

munité, mais très compliqués et d'interprétation difficile à cause de l'incertitude où nous sommes de la nature des substances en réaction.

HÉMOLYSE PAR L'EAU DISTILLÉE ET PAR LES SOLUTIONS HYPOTONIQUES

L'hémolyse par l'eau distillée est la plus simple et la plus importante. Si la goutte de sang est mise en présence d'une grande quantité d'eau, dans plusieurs centimètres cubes par exemple, la diffusion de l'hémoglobine est immédiate et complète. Si on ajoute ensuite au liquide un peu de chlorure de sodium, il se forme un précipité constitué par les nucléo-protéides de l'hématie. A la diffusion de l'hémoglobine s'est donc ajoutée une destruction à peu près complète du globule (1). Si au contraire le sang est mélangé à une très petite quantité d'eau distillée, juste suffisante pour produire la diffusion du pigment sanguin, les stromas apparaissent au microscope sous l'aspect de petites sphères extrêmement pâles (v. chap. II).

Si, au lieu de nous servir d'eau distillée, nous nous servons de solutions salées, de chlorure de sodium par exemple, l'hémolyse ne se produira pas dans les solutions *isotoniques*, ayant une concentration moléculaire voisine de celle du sérum sanguin. Les hématies des Mammifères commencent à perdre leur hémoglobine dans les solutions voisines de 0,50 p. 1.000 et tous les globules sont en général détruits dans les solutions à 0,30-0,40 p. 1.000. Cette limite inférieure s'abaisse chez les embryons. Ces limites de concentration peuvent être, en effet, modifiées, élevées ou abaissées, suivant l'espèce animale, et dans la même espèce, suivant les conditions physiologiques ou pathologiques.

Les solutions dont la concentration moléculaire est voisine de celle du sérum sanguin, pour une espèce considérée, sont dites isotoniques avec le sérum sanguin, ou plus simplement *isotoniques ;* celles dont la concentration est nettement inférieure seront appelées *hypotoniques*. On entend généralement par cette expression, lorsqu'on ne spécifie pas, les solutions situées au-dessous de la concentration-limite. Enfin, les solutions supérieures aux concentrations normales seront dites *hypertoniques ;* pratiquement, on entend par cette expression, généralement, les solutions dont la concentration est supérieure à celle de la solution de chlorure de sodium à 1 p. 100.

(1) Nous avons pris comme exemple les hématies des Mammifères et ce sont elles que nous aurons toujours en vue lorsque l'espèce animale ne sera pas spécifiée.

Si l'on examine ce qui se passe dans les solutions de NaCl immédiatement supérieures à 1 p. 100, on constate qu'elles conservent les globules, comme les solutions isotoniques : l'hémoglobine ne diffuse pas. Mais si on élève progressivement la concentration, on observe, à partir de 10-15 p. 100 une certaine diffusion de l'hémoglobine (1).

Théories de l'hémolyse par l'eau distillée. — L'explication de l'hémolyse dans l'eau distillée et dans les solutions hypotoniques a d'abord été cherchée uniquement dans les phénomènes d'osmose et dans la pression osmotique. Cette explication a été fructueuse, parce qu'elle a permis de montrer les analogies frappantes qui existent entre les phénomènes d'hémolyse et les phénomènes de plasmolyse.

Dans l'hypothèse la plus simple, le globule rouge est considéré comme une vésicule limitée par une membrane histologique semi-perméable, membrane représentant le stroma et provenant du cytoplasme de la cellule originelle. L'hémoglobine, comme les sels, est supposée à l'état de solution dans cette vésicule. L'eau pénètre en vertu de la différence de pression osmotique qui existe entre le milieu extérieur (eau distillée ou solution hypotonique) et le milieu endoglobulaire. L'hématie se gonfle ; de discoïde, elle devient sphérique ; il arrive un moment où la paroi se déchire, ou bien ses pores s'élargissent par distension, et l'hémoglobine passe. Cette explication mécanique trop simpliste rend compte de certains faits, mais elle est en contradiction avec d'autres. Quand on observe au microscope l'action de l'eau distillée sur les globules discoïdes, on les voit devenir sphériques ; mais l'hémolyse suit immédiatement la transformation sphérique, sans qu'on assiste jamais à un éclatement ni à une déchirure, sans qu'on observe même une augmentation du diamètre de l'hématie, à partir de sa transformation en sphérule. L'étude morphologique des stromas est aussi contraire à l'idée d'un éclatement. Enfin, l'hémolyse peut se produire aussi, au moins d'une manière incomplète quand on fait agir l'eau distillée sur des globules fixés superficiellement par des solutions fixatrices faibles non coagulantes (acide osmique, formol) (2). Les globules partiellement hémolysés ont gardé la forme discoïde, ils sont seulement un peu épaissis et ont perdu l'aspect biconcave.

Contre l'hypothèse mécanique de la sortie de l'hémoglobine à travers les mailles distendues de la vésicule globulaire gonflée, on peut avancer encore les expériences dans lesquelles on a montré la possibilité de la sortie indépendante des sels et de l'hémoglobine. Ainsi *Stewart* constate que des globules rouges, mélangés à une solution hypotonique de sucre de canne, laissent diffuser dans la solution

(1) Ce phénomène serait en rapport avec la pénétration du sel dans l'hématie (Nolf, *Hémolyse*, in *Dictionnaire de Physiologie* de Ch. Richet). L'imperméabilité de la paroi globulaire n'est donc pas quelque chose d'absolu, mais pour les sels, elle varie avec la concentration. Dans les solutions à 15 p. 100 NaCl, il y a une soustraction d'eau considérable faite aux globules, qui s'aplatissent (voir ch. ii).

(2) Voir ch. ii et aussi Stewart, *J. of. Physiology*, 1899 et 1901. — D'après Armand-Delille et Launoy (*S. de Biologie*, 2 juillet 1910), les globules de mouton, bœuf, cheval, lavés dans l'eau salée et mis au contact de solutions de formol à 1 p. 300 à 1 p. 1.200 conserveraient pendant quelques jours une résistance à peu près normale vis-à-vis des solutions hypotoniques de chlorure de sodium et pourraient être employés pour les réactions de Bordet-Wassermann.

sucrée une partie de leurs sels, comme l'indique l'augmentation de la conductibilité électrique du liquide ambiant. *Calugareanu* et *V. Henri* (1) font la même constatation avec une solution de saccharose à 7 p. 100, voisine de l'isotonie et non hémolysante. Dans ce liquide, les hématies perdent une partie de leurs sels mais elles n'abandonnent rien de leur hémoglobine. La paroi globulaire, devenue perméable aux sels, n'a pas perdu son imperméabilité à l'hémoglobine (2).

Stewart en a conclu que l'hémoglobine est combinée au stroma. Certains auteurs partagent encore cette opinion. Pour eux, l'hémolyse est due à la décomposition de la combinaison chimique formée par l'hémoglobine avec le stroma ; l'eau distillée à elle seule serait capable de rompre cette combinaison ; ce serait une hydrolyse. La sortie de l'hémoglobine des hématies par des actions mécaniques (secousses avec des poudres inertes, pressions, gels ou dégels) (3) est peu favorable à cette idée. On a objecté, contre l'hypothèse d'une dissolution, la faible solubilité de l'hémoglobine ; mais rien n'empêche d'admettre une solution sursaturée, idée qui cadrerait bien avec la facilité avec laquelle l'hémoglobine cristallise dans certains globules comme ceux du rat. Il est donc infiniment plus probable que l'hémoglobine est à l'état libre et non combinée chimiquement dans le globule (4) ; mais la théorie purement mécanique qui subordonne sa sortie à l'éclatement de la membrane, à sa déchirure ou à la la dilatation de ses pores par un excès de gonflement n'est pas en conformité avec les faits. Sous l'action de la chaleur, des liquides hypotoniques, de la lymphe, des sérosités, les globules rouges peuvent se fragmenter en sphérules qui restent quelque temps colorées (5). Du reste, si l'existence d'une membrane histologique est probable dans les hématies des Mammifères, elle est plus douteuse dans les hématies nucléées elliptiques des Sauropsidés et des Ichtyopsidés (voir chap. II). L'existence d'une membrane histologique n'est pas nécessaire pour expliquer les phénomènes d'osmose qui se passent dans la cellule; ces phénomènes peuvent se produire à la limite de protoplasmas nus ; la moindre différenciation les permet. Depuis longtemps, les botanistes ont individualisé la portion périphérique de masses protoplasmiques nues, comme aussi la couche limitante des vacuoles : ce sont les membranes plasmatiques de *Pfeffer* et de *de Vries;* elles seraient formées de complexes colloïdaux ; ce ne sont pas des membranes histologiques.

Si la pression osmotique peut expliquer la pénétration ou la sortie de l'eau, elle rend plus difficilement compte de la diffusion des substances dissoutes. Si l'on admet les globules rouges limités par une membrane, cette membrane ne laisse pas passer l'hémoglobine, dans les conditions normales ; elle est également imperméable aux sels du plasma comme à ceux du liquide endoglobulaire ; c'est ce qui résulte de l'analyse chimique du sang de quelques mammifères (cheval, porc,

(1) Calugareanu et V. Henri, *S. de Biologie*, 22 février 1902.

(2) On pourrait à la rigueur dire que les sels, substances cristalloïdes à petites molécules passent d'abord et que l'hémoglobine, colloïde à molécules volumineuses, ne peut passer qu'avec une distension plus grande des pores de la membrane. Mais cette explication ne peut valoir, car l'inverse peut se produire, au moins dans quelques cas, comme l'a vu Stewart.

(3) Rollett, *Stricker's Handbuch ;* — Rywosch, *Centralblatt f. Physiologie*, XIX, 1905 ; — Meltzer, *Zeitschrift f. Biologie*, XXX, 1894 ; *The Johns Hopkins Hospital Rep.*, IX, 1900 ; — Meltzer et Welch, *J. of Physiology*, V, 1884-85 et *Centralblatt f. die med. Wiss.*, 1884.

(4) Elle est à l'état de combinaison physico-chimique. Voir ch. IV et plus loin.

(5) Cf. ch. II et Froin, Th. Paris, 1904.

lapin), chez lesquels les hématies ne contiennent pas de trace de sodium, tandis que cet élément est abondant dans le plasma. Mais les sels peuvent diffuser en milieu sucré légèrement hypotonique et l'hémoglobine diffuse dans l'eau distillée et dans les milieux fortement hypotoniques. Il a donc fallu admettre que la perméabilité de la membrane était modifiée, soit d'une manière transitoire, par exemple pour le passage des sels, soit d'une manière définitive, irréversible, pour la diffusion de l'hémoglobine. Pour expliquer ces modifications, on a fait intervenir, en plus de la concentration moléculaire et de la pression osmotique, l'état de dissociation des solutions et la qualité particulière de leurs éléments dissociés ou *ions*.

On admet aujourd'hui que dans les solutions aqueuses de corps capables de subir la dissociation, les réactions chimiques sont des réactions d'ions (1). La capacité d'intervenir n'appartient qu'aux ions libres et pas aux molécules non dissociées. La puissance de réaction d'une solution est en rapport avec le nombre des ions libres qu'elle contient ; elle est proportionnelle à son degré de dissociation. C'est ce qui explique les propriétés particulières de réaction de certains corps dilués, des acides par exemple.

On a donc fait intervenir les ions dans les explications théoriques qui ont été données de l'hémolyse. Ce n'est plus seulement la concentration moléculaire qu'il faut envisager dans le passage de l'eau, des sels et de l'hémoglobine, c'est aussi l'état de dissociation de la solution. La nature des ions, leurs propriétés chimiques ou physiques, leur charge électrique, leur vitesse de transport, leur pouvoir précipitant sur les colloïdes sont capables de modifier la perméabilité de la membrane ; au lieu d'avoir une membrane semi-perméable, on aura une membrane à perméabilité variable. Si la membrane est conçue comme formée de colloïdes, sa perméabilité sera le résultat de la réaction des ions sur les complexes colloïdaux qui la composent.

On aura une membrane à perméabilité variable, et ces variations, conditionnées par la fixation des ions, permettront ou ne permettront pas, suivant les cas, son imbibition et la diffusion de l'hémoglobine. Il ne sera plus nécessaire d'imaginer une distension mécanique, ou un éclatement, hypothèse que le microscope ne vérifie pas (2).

Mais s'il n'y a pas de membrane histologique et si la membrane physiologique est considérée seulement comme formée par des colloïdes, il n'est peut-être pas nécessaire de concevoir ces substances disposées en une couche membraniforme. Les phénomènes pourraient tout aussi bien s'expliquer en imaginant la masse de l'hématie comme formée par des complexes colloïdaux diversement associés, et non plus comme une vésicule creuse limitée par une membrane colloïde.

Le problème qui se pose ici est un problème d'imbibition. Les expériences de *Hofmeister*, *Pauli*, *Spiro*, *Nolf* (3), sur l'imbibition des disques de gélatine par

(1) Hollard, *la Théorie des Ions et l'Électrolyse*, Paris, 1900 ; Ambard et Mayer, *Sem. méd.*, 30 août 1905.

(2) Overton a supposé que la membrane était formée de lipoïdes. Cette manière de voir permet d'expliquer la pénétration de corps insolubles ou peu solubles dans l'eau, mais solubles dans les lipoïdes. Mais l'hypothèse d'Overton rend très difficile l'explication de la pénétration de l'eau, et par conséquent de l'hémolyse. Il faudrait alors admettre l'existence d'autres substances qui, ajoutées aux lipoïdes, faciliteraient ou limiteraient leur émulsion avec l'eau (voir plus loin).

(3) Hofmeister, *Archiv f. exp. Path. u. Pharm.*, 1891 ; — Pauli, *Ergebnisse der Physiologie*, 1907 ; — Nolf, Hémolyse in *Dict. de Physiologie*, de Ch. Richet, *Annales Pasteur*, XIV, 1900 et *Revue gén., des Sc.*, 1901.

l'eau dans des solutions salines de nature différente montrent que le phénomène ne dépend pas seulement de la concentration moléculaire de la solution, mais de la nature du sel employé, de la qualité des ions en présence. Des disques de gélatine, déjà imbibés d'eau, absorbent encore de l'eau dans une solution de NaCl à 1 p. 100 et gonflent encore si on augmente graduellement le titre de la solution. Le sel pénètre et on retrouve au bout de quelque temps la même proportion de sel dans le milieu extérieur et dans le liquide absorbé.

Un grand nombre de sels exercent cette action (chlorure de sodium et d'ammonium, iodures de potassium, de sodium et d'ammonium, etc.) D'autres sels exercent une action un peu différente (tartrate et citrate de soude, sulfate de potassium, de sodium, de magnésium) : leurs solutions diluées agissent comme les solutions de chlorure de sodium, mais dans les solutions plus concentrées, le disque absorbe moins de liquide que dans l'eau pure et la solution absorbée est moins concentrée que le milieu extérieur.

Quand le liquide imbibant est une solution saline diluée et très dissociée, les ions jouent un rôle dans le phénomène et ce sont leurs affinités particulières qui permettent d'expliquer les différences d'effet des substances employées. La gélatine absorbe avec avidité tous les chlorures, bromures, iodures alcalins et alcalino-terreux tandis que son pouvoir d'absorption pour les sulfates, tartrates, citrates des mêmes métaux est très limité. Elle paraît donc être surtout sensible à la nature chimique de l'anion. Avec d'autres substances colloïdes, c'est au contraire la nature du cation qui semble prévaloir comme dans les expériences de *Loeb* sur l'imbibition des muscles de grenouille dans des solutions isotoniques de sels de divers métaux (1).

(1) Loeb, *Archiv f. die ges. Physiologie*, LXXV, 1899. La dynamique des phénomènes de la vie, trad. fr. par Daudin et Schaeffer, Paris, 1908. L'action qualitative des ions peut aussi intervenir pour modifier l'état électrique de la paroi globulaire (cf. P. Girard, *C. R. Ac. des sc.*, 5 mai 1913). L'action qualitative des ions sur l'imbibition est très frappante dans les expériences de *Loeb* : les muscles conservent leur poids dans la solution lithinée, c'est-à-dire qu'ils ne s'imbibent pas ; ils gagnent un peu de poids (s'imbibent) dans les solutions sodiques, gagnent beaucoup dans les solutions potassiques, perdent dans les solutions calciques, quel que soit l'anion (*Cl*, *Br*, I, etc.). Seul, le cation semble jouer ici un rôle. C'est la qualité des ions qui explique que des solutions isotoniques de sels différents n'aient pas exactement le même pouvoir hémolytique. C'est la qualité des ions qui explique aussi les effets conservateurs particuliers obtenus par les solutions de *Ringer*, de *Locke*, etc., pour la conservation des tissus vivants (mouvements du cœur isolé, contraction des muscles, etc.). Les solutions isotoniques ne contenant que du chlorure de sodium ne produisent pas les mêmes effets ; la concentration moléculaire n'est donc pas seule ici à intervenir. Voici quelques formules de ces solutions :

Solution de Ringer, pour 100 centimètres cubes d'eau distillée :

0,9 NaCl
0,02 $CaCl^2$
0,02 KCl
0,01 $NaHCO^3$.

Solution de Locke, pour 100 centimètres cubes d'eau distillée :

0,9 NaCl
0,02 $CaCl^2$
0,01 KCl.

Solution de Locke (pour la grenouille), pour 100 cc. d'eau distillée :

0,6 NaCl
0,02 $CaCl^2$
0,01 KCl.

On a proposé de nombreuses variantes de ces formules. Voir aussi les travaux de

C'est que l'absorption est ici compliquée, par des phénomènes de surface ou *d'adsorption*. On entend sous ce nom les phénomènes d'adhérence intime, de liaison particulière qui se produisent entre un solide et un liquide à la surface de séparation.

Quand un liquide comme l'eau est adsorbé par un solide, deux cas peuvent se présenter : ou l'eau est pure ou elle contient un corps en dissolution. Dans le premier cas, la couche d'adsorption contient simplement les molécules d'eau dans un état d'attraction particulière qu'on nomme l'attraction capillaire. Dans le second cas, le phénomène est plus compliqué : la zone d'adsorption contient le corps dissous en concentration différente de la concentration du liquide. De plus, si le corps est un électrolyte, c'est-à-dire un corps susceptible de dissociation, ses ions peuvent, suivant leur nature, être plus ou moins fixés.

Des actions de ce genre se produisent avec les solutions colloïdales. Celles-ci ne sont que des émulsions extrêmement fines ; l'emploi de l'ultra-microscope est venu démontrer le fait d'une manière frappante au moins pour beaucoup d'entre elles (1). Les granules en suspension peuvent présenter des phénomènes d'absorption. Ils peuvent présenter aussi des phénomènes d'*adsorption*. Ceux-ci dépendent de la *surface ;* ils seront donc d'autant plus intenses que la substance sera divisée en grains plus petits. On admet que les granules sont tenus séparés dans une suspension parce qu'ils sont tous porteurs d'une charge électrique de même signe. Or, les colloïdes organiques, au contact de solutions contenant des électrolytes peuvent contracter, avec les ions libérés par la dissociation, des combinaisons d'adsorption. Les colloïdes protéiques de la cellule pourront ainsi constituer des complexes particuliers capables de former des combinaisons avec l'eau. Dans les expériences d'absorption avec les disques de gélatine immergés dans des solutions salées, la courbe d'absorption d'eau est modifiée par la fixation des ions. Ce que l'on étudie, au delà d'une certaine concentration, c'est donc, avec le chlorure de sodium, l'imbibition d'une gélatine chargée d'ions Cl par adsorption. Les électrolytes agissent sur certains colloïdes en les précipitant. Ils peuvent agir de même sur les colloïdes contenus dans la cellule ; ils peuvent déterminer ou empêcher leur précipitation, c'est-à-dire modifier leur liaison avec l'eau. Par ce mécanisme, ils peuvent influencer le mouvement de l'eau tout autant que par leur pression osmotique (2).

On peut donc imaginer dans le protoplasma des mouvements d'eau et de sels tout à fait distincts de ceux qui se passent à travers une membrane. A côté de la pression osmotique, il faut faire une place à des phénomènes physico-chimiques particuliers qui sont dus à la dissociation électrolytique et aux combinaisons que peuvent former les colloïdes entre eux, avec les ions et avec l'eau.

On peut supposer que sans être unie au stroma en véritable combinaison chimique, l'hémoglobine entre dans la structure des complexes colloïdaux qui font partie des globules et que les mouvements d'eau qui se produisent dans l'hématie la libèrent de ces connexions et lui permettent de diffuser.

Quinton sur l'eau de mer ramenée à la concentration moléculaire du sérum sanguin. On a ajouté souvent du glucose. (Voir Richet, Brodin et Saint-Girons, *Presse méd.*, 14 novembre 1918.)

(1) Voir V. Henri et Mayer, *l'État colloïdal* in *Traité de Physique de Chwolson*, éd. française, Paris, 1907, ch. x et *Revue gén. des Sciences*, 1904 ; — Duclaux, *les Colloïdes*, Paris, 1920 ; — Bayliss, *Principles of general Physiology*, London, 1915.

(2) Mayer et Schæffer, *J. de Physiologie et de Path. gén.*, XVI, janvier 1914.

Avec cette explication, il n'est plus besoin d'une membrane histologique ni même d'une membrane plasmatique ; et, de plus, l'interprétation peut être conservée, même si on admet une membrane. La membrane histologique (chez les Mammifères), la strie bordante (chez les Batraciens) rendent compte de la forme et des modifications de forme. La composition du stroma, assimilée à la phase solide d'une solution colloïdale complexe, rend compte des échanges d'eau et de l'hémolyse. Ce sont deux choses différentes.

Récemment, le problème de l'absorption de l'eau dans les cellules a été envisagé d'une manière différente par *Mayer* et *Schaeffer* (1). Au lieu d'aborder le problème par son côté dynamique, les auteurs l'abordent par son côté statique. Ils supposent que les échanges d'eau sont déterminés par la constitution chimique du protoplasma. En plus des sels, celui-ci contient des hydrates de carbone, des albuminoïdes et des lipoïdes qui se trouvent à l'état colloïdal. Les complexes albuminoïdes ont avec l'eau une forte liaison et sont le plus souvent à l'état de gels (2). Ce sont des colloïdes hydrophiles. Les lipoïdes et les graisses considérés isolément, ne sont pas miscibles à l'eau. Quand ils entrent dans des complexes (3), ils constituent généralement un obstacle à la liaison du colloïde avec l'eau. Parmi les corps que l'on fait communément rentrer dans la catégorie des lipoïdes, la cholestérine possède pourtant sur ce point, une propriété remarquable : si on l'incorpore à des corps non miscibles à l'eau, elle leur donne le pouvoir de s'imbiber d'eau. Or, jusqu'ici, la présence de la cholestérine a été constatée dans toutes les cellules.

On peut considérer le protoplasma comme composé de corps miscibles à l'eau (sels et protéiques) et de corps non miscibles à l'eau (composés d'acides gras et cholestérine). Si un gel albuminoïde ne contenait, en plus de l'albumine, que de la cholestérine, celle-ci, insoluble dans l'eau, diminuerait donc la liaison de la masse totale avec l'eau, et d'autant plus qu'elle serait plus abondante. Les composés d'acides gras joueront le même rôle ; plus le gel albuminoïde contiendra de combinaisons d'acides gras, moins il sera susceptible de se laisser imbiber par l'eau. Mais cholestérine et composés d'acides gras sont réciproquement solubles et le mélange qui résulte de cette solubilité réciproque est pénétrable par l'eau. La résistance à l'imbibition due aux corps gras pourra donc être corrigée par la présence de la cholestérine. Donc, plus un gel albuminoïde mêlé de lipoïdes contiendra de cholestérine, plus le gel s'imbibera d'eau. Le rapport $\frac{\text{cholestérine}}{\text{acide gras}}$ ou *coefficient lipocytique*, sera donc en relation étroite avec l'imbibition des cellules.

Or, il résulte des analyses de *Mayer* et *Schæffer* que pour une espèce animale considérée, pour un tissu déterminé, la teneur en eau varie dans des limites très étroites ; sa proportion est constante ; l'eau est une *constante cellulaire*. Mais l'eau est inégalement répartie dans les différents tissus. Les résultats varient suivant l'espèce animale, mais l'ordre d'imbibition des différents tissus est le même, quelle que soit l'espèce : poumon et cerveau, rein, muscle, foie. La teneur en eau est donc une valeur caractéristique d'un tissu donné ; mais dans les tissus homologues, cette teneur varie d'une espèce à l'autre. D'une façon générale, la teneur des tissus en

(1) Mayer et Schaeffer, *J. de Phys. et de Path. gén.*, XVI, n° 1, janvier 1914, pp. 1 et 23.

(2) Solutions colloïdales homogènes, à granules agglomérés.

(3) Édifices physiques formés du groupement de molécules et d'ions.

eau est d'autant plus forte que le coefficient lipocytique $\left(\frac{\text{cholestérine}}{\text{ac. gras fixes}}\right.$ ou $\left.\frac{\text{cholestérine}}{\text{phosphore lipoïdique}}\right)$ est plus grand. Si, au lieu de déterminer la teneur en eau des divers tissus recueillis sur l'animal qu'on vient de sacrifier, on cherche quelle est la quantité maxima d'eau que peuvent absorber des fragments de poids déterminé de ces tissus, on obtient des résultats tout à fait conformes aux précédents. En général, l'imbibition maxima est proportionnelle au coefficient lipocytique. Le facteur d'imbibition étudié par les auteurs persiste donc après la mort. Les expériences montrent que ce n'est pas la quantité absolue des lipoïdes qui intervient, puisque le cerveau qui contient trois fois plus de lipoïdes que le foie, se gonfle cependant trois fois plus ; c'est leur rapport qui influe surtout. Ainsi, dans l'ensemble, les tissus placés dans l'eau pure s'imbibent d'autant plus que leur coefficient lipocytique est plus élevé.

Nous avons eu l'occasion de citer plus haut des expériences d'imbibition et nous avons vu que l'imbibition, lorsqu'on plonge les tissus dans des solutions salées, ne dépend pas uniquement de la concentration moléculaire du milieu. C'est ce que constatent aussi *Mayer* et *Schæffer*. Au lieu de perdre de l'eau dans les solutions hypertoniques, les tissus, ou au moins certains d'entre eux, continuent à s'imbiber, même dans les solutions extrêmement concentrées (70, 100 p. 1.000 NaCl). Or, ceux qui s'imbibent le plus sont justement ceux dont le coefficient lipocytique est le plus élevé : cerveau et poumon.

Les différents tissus ne réagissent pas de la même manière. La courbe d'imbibition de chaque tissu a sa physionomie propre. La concentration moléculaire ne joue donc pas seule. L'imbibition des tissus varie avec la concentration du milieu et dans l'ensemble, quelle que soit l'électrolyte, diminue au fur et à mesure que la concentration augmente. Mais les différents ions n'ont pas la même action : les résultats varient suivant qu'il s'agit des cations K ou Na. Cette action propre, qualitative des ions, varie suivant les tissus, et en même temps que la teneur en lipoïdes du tissu considéré. Ainsi, l'action inhibitrice de Ca sur l'imbibition paraît se faire davantage sur des tissus riches en acides gras. Le résultat de l'action des sels sur la teneur en eau des cellules semble dû ainsi, non pas à leur action seule, mais à une interaction entre les électrolytes et les lipoïdes constituants des tissus.

Il était important d'examiner, à la lumière de ces nouvelles idées, l'hémolyse des globules rouges des différentes espèces animales dans les solutions salées de diverses concentrations. On pouvait se demander si l'hémolyse ne se faisait pas d'autant plus facilement que le coefficient lipocytique est plus grand. L'expérience répond par l'affirmative (1). L'ordre de résistance est le suivant : mouton, porc et cheval, bœuf et lapin, chien et cobaye, poule. Or, cet ordre est à peu près le même que celui du coefficient lipocytique. D'une manière générale, les globules rouges paraissent d'autant plus facilement hémolysables par l'eau que leur coefficient lipocytique est plus fort. Les coefficients lipocytiques des globules des différents mammifères sont extrêmement voisins les uns des autres ; aussi est-il fréquent d'observer des inversions d'ordre entre globules à coefficients très voisins ; mais d'une manière constante, on trouvera toujours, comme les moins

(1) Mayer et Schæffer, *J. de Phys. et de Path. gén.*, XV, 1913 et XVI, 1914. Voir aussi Rywosch, *Pflüger's Archiv*, CXVI, 1907.

résistants, les globules du mouton, qui possèdent le coefficient le plus fort (44) et comme les plus résistants, ceux du chien et de la poule qui ont les coefficients lipocytiques les plus faibles (30 et 29).

L'étude de l'hémolyse par l'eau distillée et les solutions salines nous permet donc déjà d'entrevoir, parmi les facteurs nombreux de l'hémolyse, trois conditions importantes :

1° La concentration moléculaire du milieu et la tension osmotique qui en est la conséquence immédiate ;

2° La faculté d'imbibition des colloïdes qui entrent dans la composition de l'hématie et l'action qualitative des ions dissociés de la solution saline sur la liaison des complexes colloïdaux avec l'eau ;

3° La teneur des hématies en lipoïdes et en particulier le rapport lipocytique, facteur d'imbibition et par conséquent facteur de résistance.

RÉSISTANCE DES GLOBULES ROUGES

En étudiant les liquides conservateurs des hématies, *Malasse* avait vu que les solutions salines de chlorure de sodium et de sulfate de soude devaient être employées à un titre déterminé variable suivant les espèces. Dans les solutions bien conservatrices, les globules rouges se détruisaient pourtant, mais avec une extrême lenteur. Dans les mêmes conditions, et pour un même sang, la vitesse de cette destruction était à peu près constante. En faisant, avec le même mélange, à des intervalles réguliers, des numérations, il était facile de tracer la courbe de cette chute globulaire. Plus cette chute est rapide plus les globules sont altérables ; et, de la même manière, plus elle est lente, plus les globules sont dits résistants. *Malassez* se servait d'une solution de sulfate de soude d'une densité de 1020 à 1022. Il put, à l'aide de cette méthode, faire quelques constatations intéressantes et voir par exemple, que les globules rouges étaient moins altérables, ou, si l'on veut, plus résistants, dans l'anémie saturnine que dans celle de la tuberculose et du cancer (1).

Chanel (2) se servit aussi de la numération pour apprécier la résistance des globules rouges. Au lieu de faire des numérations successives d'un même mélange, il fait des mélanges avec des solutions salines de plus en plus diluées. Il détermine le nombre des globules détruits dans un même temps, dans les diverses solutions. A l'aide de cette méthode, il constate la diminution de résistance des globules rouges dans les anémies et leur augmentation de résistance dans certains ictères.

(1) Malassez, *S. de Biologie*, 12 janvier 1895.

(2) Chanel, Th. Lyon, 1880 ; — Urcelay, Th. Paris, 1895 ; — Vaquez, *XIIIe Congrès int. méd.*, Paris, 1900.

Bien qu'elles aient conduit à des résultats concordants (1), les méthodes d'évaluation de la résistance basées sur la numération n'ont plus guère qu'un intérêt historique et la méthode reposant sur l'hémolyse est à peu près seule employée aujourd'hui.

Le principe de la méthode a été donné par *Mosso* (2) et par *Hamburger* (3). De petits tubes à essai sont remplis de solutions de NaCl de titre croissant (0,3 à 0,8 p. 100). On ajoute à chacun de ces tubes un même nombre de gouttes d'une émulsion de globules dans l'eau salée à 8 p. 1.000. L'émulsion est constituée par le dépôt du dernier lavage. On laisse sédimenter et l'on observe ce qui s'est passé dans chaque tube ; on note la concentration de la solution dans laquelle l'hémoglobine a commencé à diffuser. Elle correspond chez l'homme normal à 0,45 environ. Plus cette limite s'abaisse, plus les globules sont dits résistants.

L'appréciation de la diffusion de l'hémoglobine se fait par l'observation à l'œil nu, le pigment sanguin diffusé colorant la solution saline. Le premier tube dans lequel a commencé la diffusion est légèrement jaunâtre, le suivant sera rosé, le troisième franchement rouge (4). Tous les globules d'un même sang n'ayant pas une résistance identique, l'hémolyse sera progressive, le liquide de plus en plus coloré et le dépôt globulaire de plus en plus petit ; enfin la solution est vivement colorée, le dépôt nul : l'hémolyse est totale.

Il est quelquefois utile, dans certaines expériences, d'évaluer la grandeur de la diffusion d'une manière plus précise. L'hémoglobine diffusée est alors dosée à l'aide du colorimètre (5). On peut établir ainsi la courbe de résistance, c'est-à-dire la grandeur de la diffusion entre la solution où tout est hémolysé et celle où la destruction commence. Pour obtenir une approximation plus grande, il faut se débarrasser du plasma et multiplier les solutions. Les globules rouges sont lavés trois fois à l'eau salée à 9 p. 1.000 et centrifugés chaque fois. Le dépôt globulaire est repris par l'eau salée de façon à obtenir une émulsion à 5 p. 100 qui est répartie dans des tubes à

(1) A l'aide de la méthode de *Malassez*, *Vaquez* et *Marcano* ont montré la diminution de résistance des hématies au cours des accès d'hémoglobinurie paroxystique (*S. de Biologie*, 25 janvier 1896 et *Arch. de méd. exp.*, 1896).

(2) Mosso, *Archives italiennes de biologie*, VIII, 1887.

(3) Hamburger, *XIIIe Congrès int. de méd.*, Paris, 1900 ; *J. de Physiologie et de Path. gén.*, 1900 et *Osmotischer Druck und Ionenlehre*, Wiesbaden, 1902.

(4) Ces trois degrés sont souvent notés dans les expériences : H^1 (teinte jaune), H^2 (teinte rosée), H^3 (hémolyse totale).

(5) Lapicque et Vast, *S. de Biologie*, 13 mai 1899 ; — Vast, Th. Paris, 1899 ; — Lesage, *S. de Biologie*, 28 juillet 1900.

essai ; chaque tube contient un volume égal de l'émulsion ; on ajoute l'eau distillée en quantité croissante après avoir préalablement additionné les prises des quantités d'eau salée nécessaires pour que le volume soit partout égal. On laisse deux heures à 37° ; au bout de 18 heures, après sédimentation on fait une prise du liquide surnageant et on dose au colorimètre de Duboscq la quantité d'hémoglobine qu'il contient en comparant à une émulsion témoin totalement hémolysée. L'hémolyse totale correspond au nombre 100, les chiffres obtenus représenteront le pourcent d'hémoglobine diffusée (1).

En étudiant avec cette méthode le sang des espèces animales différentes, en prenant comme indice de la résistance le début de l'hémolyse ou l'hémolyse totale, on constate des différences suivant l'espèce et il y a un ordre de résistance croissant : les globules les moins résistants étant ceux des mammifères à petites hématies (mouton, cheval, etc.), les globules les plus résistants étant représentés par ceux du chien, du cobaye, de la poule (voir plus haut).

D'une manière générale, les globules rouges nucléés des Vertébrés inférieurs (Reptiles et surtout Batraciens) sont plus résistants que ceux des Mammifères. Chez les Mammifères, il existe un parallélisme entre la dimension du globule et la résistance globulaire aux solutions de chlorure de sodium : les globules les plus gros (homme, cobaye, singe, chien) sont les plus résistants ; les globules les plus petits (bœuf, mouton, chèvre) sont les moins résistants. La résistance minima qui est de 0,42 à 0,48 chez l'homme, s'élève à 0,52 chez le lapin, à 0,56 chez le rat, à 0,66 chez le bœuf, à 0,74 chez le mouton et la chèvre. Cet ordre est le même que celui des diamètres (2). Il est vraisemblable que l'hémolyse est facilitée par l'étendue de la surface de contact. Ce parallélisme n'existe pas chez les animaux à globules rouges nucléés ; toutefois les résistances minima les plus élevées correspondent aussi aux globules les plus volumineux (0,24-0,30 chez les Batraciens ; 0,24-0,38 chez les Reptiles).

On a aussi utilisé, pour évaluer la résistance des globules rouges, d'autres agents. Les agents physiques (chaleur, électricité, etc.) ne se prêtent pas en général aux mesures exactes et ne présentent pas beaucoup d'intérêt. Mais on a essayé aussi un grand nombre de substances hémolytiques (saponine, venins, sérums hémolytiques, etc.). Dans ces différents cas, les tubes à essai sont remplis

(1) Mayer et Schaeffer, *J. de Physiologie et de Path. gén.*, 1911.

(2) Pasteur Vallery-Radot et Lhéritier, *S. de Biologie*, 1er mars 1919. Chez les Poissons et les Oiseaux, les chiffres se rapprochent de ceux des Mammifères.

d'une solution de chlorure de sodium à 7 p. 1.000 et on ajoute des quantités croissantes de la substance hémolytique (1).

Étude clinique de la résistance globulaire. — La méthode de Hamburger a été appliquée à l'étude clinique de la résistance globulaire (2). Au début de ces recherches, on employait le sang pur. On ne se sert plus aujourd'hui que de purées de globules rouges émulsionnées dans une solution saline (3).

Le sang peut être obtenu par ponction d'une veine du pli du coude. La ponction est faite avec une aiguille, ou bien le sang est aspiré dans une seringue en verre contenant un peu de liquide anticoagulant. Quelques centimètres cubes de sang sont reçus dans la solution suivante, qui est isotonique :

Oxalate de potasse.	2 grammes
Eau distillée	100 —

Une faible quantité de cette solution suffit à empêcher la coagulation. Les globules sont séparés du plasma par une centrifugation prolongée (4).

On décante le liquide surnageant ; on utilise la purée globulaire du sédiment. Pour préparer la série des solutions de titre décroissant, on part d'une solution de chlorure de sodium à 7 p. 1.000 préparée avec de l'eau distillée (5). On se sert de tubes à essai d'environ 6 centimètres de haut et de 1 centimètre de diamètre. Ces tubes doivent être propres et secs.

On utilise environ 24 tubes. A l'aide d'une pipette à boule (6), on verse d'abord dans chaque tube, un nombre croissant de gouttes d'eau distillée (7), 2, 4, 6, 8, etc., puis un nombre décroissant de gouttes de la solution salée : 68, 66, 64, etc., avec la même pipette, après l'avoir rincée. Le premier tube contenant la solution mère, on obtient ainsi une série de tubes contenant des solutions de titre

(1) En comparant les différentes espèces animales, on a pu établir un ordre de résistance croissante à l'action de la saponine, du chloroforme, etc. (Rywosch, *Archiv f. ges. Physiologie*, CXVI, 1907), à la solanine, au sérum d'anguille (Brachrach et Grafe, *Archiv f. Hygiene*, LXX, 1909), au venin de cobra, à l'abrine (Kyes et Sachs, *Berliner Klin. Woch.*, 1903). L'ordre de résistance varie avec l'agent considéré ; avec l'oléate de soude, il est à peu près inverse de celui qu'on observe avec les solutions salines hypotoniques, Vis-à-vis des sérums hétérogènes, il est encore différent (Mayer et Schaeffer, *C. R. Ac. des Sc.*, 14 octobre 1912). (Voir plus loin : Hémolyse par les sérums).

(2) Vaquez, *S. de Biologie*, 5 février 1898 et *Congrès int. méd. Paris*, 1900 ; — Ribierre, Th. Paris, 1903.

(3) Hématies déplasmatisées ou lavées. Widal et Abrami, *S. méd. des Hôpitaux*, 8 novembre 1907, p. 1127 ; — Widal, Abrami et Brulé, *S. de Biologie*, 19 octobre 1907 et *Presse médicale*, octobre 1907 ; — Brulé, Th. Paris, 1909. L'emploi d'hématies débarrassées du plasma a permis de déceler la fragilité globulaire dans des cas où l'emploi du sang pur montrait une résistance normale.

(4) Brulé, Th. Paris, 1909 ; — May, Th. Paris, 1914.

(5) Dans certains cas, pour des sangs à hématies très fragiles, il peut être utile de partir d'une solution plus forte, à 8 ou 9 p. 1.000. On emploie pour ces solutions, du chlorure de sodium décrépit, ne contenant plus d'eau de condensation.

(6) Pour répartir l'eau distillée et la solution saline, il faut employer le même compte-goutte et le tenir incliné suivant un angle constant, afin d'obtenir des gouttes de même volume.

(7) Il est nécessaire de mettre d'abord l'eau distillée.

décroissant : 0,70, 0,68, 0,66 p. 100, etc., et jusqu'à 0,2 ou 0,3. On ajoute dans chaque tube une goutte de l'émulsion d'hématies. Chaque tube est ensuite agité afin d'effectuer convenablement le mélange des globules et des solutions. On laisse reposer quelques minutes, puis on centrifuge. On note le début de l'hémolyse. L'hémolyse initiale (H^1) est marquée par l'apparition d'une teinte jaune dans le liquide surmontant le sédiment ; l'hémolyse franche (H^2) est caractérisée par une teinte rose ; enfin l'hémolyse totale (H^3 ou Ht) est celle où le culot globulaire, minime, est surmonté d'une liquide rouge cerise, ne montrant plus d'ondes soyeuses par agitation (1).

La résistance des hématies est exprimée par le titre de la solution qui a produit l'hémolyse initiale. Elle varie chez l'homme, à l'état normal, entre 0,42 et 0,48 (2). Les variations physiologiques peuvent être, cependant, plus étendues. On s'accorde, généralement, à considérer que la résistance est augmentée au-dessous de 0,40 et qu'elle est diminuée au-dessus de 0,50.

Courbes de résistance. — On a cherché à perfectionner cette technique afin de pouvoir apprécier des différences de résistance plus délicates et à dresser des courbes du phénomène (3).

On exprime le degré de l'hémolyse, dans chaque tube, par un chiffre qui corresponde à la quantité de globules détruits. On s'adresse à la méthode colorimétrique (4). On peut préparer, extemporanément, une échelle colorimétrique, avec le sang même dont on cherche à apprécier la résistance (5). On réalise dans plusieurs tubes une hémolyse totale avec de l'eau distillée, en employant un volume d'eau égal à celui des solutions contenues dans les divers tubes à hémolyse. On dilue ensuite cette solution à des titres connus, de façon à obtenir une échelle de teintes qui correspondent à 1/20, 1/10, 2/10, etc., de l'hémolyse totale. A cette fin, on verse, par exemple, dans 9 tubes, avec une pipette à boule, un nombre de gouttes progressivement croissant de la solution où l'hémolyse est totale et un nombre progressivement décroissant de gouttes d'eau distillée.

Dans les tubes où se fait l'épreuve de l'hémolyse, l'hémolyse est dite totale lorsque le culot de globules rouges disparaît au fond des tubes. Son appréciation est plus délicate que celle de l'hémolyse initiale.

En étudiant, chez des sujets normaux, la grandeur de l'hémolyse pour chaque tube, on peut obtenir des courbes représentant la marche de l'hémolyse (6).

(1) Le culot globulaire ne disparaît pas tout à fait, même dans l'eau distillée. Le mode de soustraction du sang, le temps de contact de la solution salée et des globules, les volumes en présence, la température, etc., sont des facteurs capables de modifier les résultats. Toutefois, pratiquement, quand on opère dans les mêmes conditions, les résultats sont concordants.

(2) Les chiffres qu'on obtient en employant le sang total au lieu des hématies déplasmatisées sont un peu plus forts (0,44 à 0,58).

(3) May, Th. Paris, 1914.

(4) Lapicque et Vast, *S. de Biologie*, 13 mai 1899, et Vast, Th. Paris, 1899.

(5) May, *l. c.*

(6) Lapicque, *S. de Biologie*, 28 juillet 1900. et Exposé de Titres, 1900.

Les hématies à résistance moyenne sont en très grand nombre, tandis que les hématies à résistance extrême (très fragiles et très résistantes) sont très peu nombreuses. Bien que différentes au point de vue de leur résistance, les hématies se groupent autour d'une valeur moyenne.

L'étude de ces courbes de résistance dans les états pathologiques permet de juger de l'étendue des lésions sanguines, lorsque la résistance diminue et lorsqu'elle augmente. Lorsque la résistance augmente, cette résistance peut porter sur toutes les hématies. Dans d'autres cas, comme on le voit après les hémorragies, cette augmentation ne porte que sur un très petit nombre d'hématies ; seule, la partie terminale de la courbe s'allonge ; cette augmentation limitée de la résistance maxima paraît en rapport avec l'abondance des globules jeunes. Elle serait donc un signe de la régénération sanguine.

D'après certaines recherches, les hématies du fœtus sont plus résistantes que celles de l'adulte. Les jeunes hématies apparues pendant la régénération, à la suite des hémorragies ou des intoxications, seraient aussi des hématies plus résistantes (1).

Variations de la résistance globulaire dans les états pathologiques. — La résistance des hématies aux solutions hypotoniques a été trouvée, en général, diminuée dans les anémies graves (2). Elle l'est souvent dans l'anémie cancéreuse, bien que d'une manière inconstante. Dans les anémies secondaires, les résultats sont très variables. La résistance est presque toujours diminuée dans l'hémoglobinurie paroxystique au moment des crises.

Dans les ictères par rétention, la résistance a été trouvée, en général, *augmentée* (3). Mais cette augmentation de résistance est moins constante qu'on ne l'avait d'abord cru.

La *diminution* de la résistance est constante dans toute une catégorie d'ictères congénitaux familiaux dans lesquels la coloration de la peau est due à une destruction exagérée d'hématies. Ce sont les ictères hémolytiques (4). Il existe aussi des ictères hémolytiques acquis, non congénitaux, dans lesquels la diminution de résistance existe encore, bien qu'à un moindre degré (5).

(1) Hamburger, *Osmotischer Druck* ; — Snapper, *Bioch. Zeitschrift*, XLIII, 1912.

(2) Weissenbach, Thèse Paris, 1915.

(3) Chanel, Th. Lyon, 1880. — Vaquez et Ribierre, *S. de Biologie*, 26 juillet 1902 ; — Ribierre, Th. Paris, 1903.

(4) Voir ch. xvi.

(5) Widal, Abrami et Brulé, *Presse méd.*, octobre 1907 et *Archives des maladies du cœur et du sang*, avril 1908 ; — Brulé, Th. Paris, 1909.

HÉMOLYSE PAR DES SUBSTANCES CHIMIQUES DÉFINIES

L'hémolyse par l'eau distillée et par les solutions salines faibles a été la première étudiée. Elle paraissait d'abord un phénomène simple, explicable par les seules lois de la pression osmotique. Puis, on découvrit les propriétés hémolytiques de certains sérums ; on se trouvait en présence de faits beaucoup plus compliqués, que les conditions physiques de l'expérience ne permettaient plus d'expliquer. C'est pour chercher à élucider leur mécanisme qu'on se mit à étudier l'hémolyse due à des substances chimiques définies (1).

Les acides et les bases dilués provoquent l'hémolyse en solution salée isotonique. Dans les acides très dilués, en solution saline isotonique, les hématies gonflent et deviennent sphériques, et l'hémoglobine diffuse. Comme l'a montré *Hamburger* (2), les solutions trop faiblement acidulées pour provoquer l'hémolyse, diminuent cependant la résistance globulaire. Les résultats varient suivant la dilution. On observe en général un optimum de concentration. L'hémolyse est presque toujours plus accentuée aux concentrations faibles qu'aux concentrations fortes. On observe du reste des faits absolument semblables lorsqu'on étudie l'action des acides, des bases et des sels sur l'imbibition de la gélatine ou du tissu conjonctif (3). Les acides forts agissent beaucoup plus vite que les acides faibles, de sorte que le degré d'hémolyse est beaucoup plus grand pour eux dans les expériences de courte durée, alors qu'il tend souvent à s'égaliser dans les expériences de durée suffisante. Acides et bases semblent agir surtout par les ions H et OH que contiennent leurs solutions ; d'où l'effet plus énergique des solutions diluées, puisque la dissociation y est plus complète.

Les alcools, les éthers, aldéhydes et acétones pénètrent facilement les hématies, et, à une certaine concentration, produisent l'hémolyse. L'affinité de ces substances pour le stroma tient probablement à la teneur de celui-ci en lipoïdes (4), toutes ces substances étant des solvants plus ou moins énergiques des lipoïdes. Le pouvoir

(1) Pour l'action spéciale de l'urée, voir plus haut.

(2) Hamburger, *Osmotischer Druck und Ionenlehre*, Wiesbaden, 1902; — Robert, *J. de Phys. et de Path. gén.*, 1906.

(3) Zachariadès, *S. de Biologie*, 24 février, 17 mars et 29 décembre 1900 et 18 janvier et 1er février 1902.

(4) Overton (*Nagel's Handbuch der Physiologie*, 1907) suppose que dans la cellule, les lipoïdes s'accumulent à la périphérie pour former une membrane. Nous avons vu plus haut la difficulté qu'entraîne cette manière de voir pour expliquer la pénétration, par

hémolytique des alcools augmente avec le nombre des atomes de carbone contenus dans la molécule ; il est plus grand pour l'alcool éthylique que pour l'alcool méthylique et plus grand pour l'alcool propylique que pour l'alcool éthylique, etc. En même temps augmente la solubilité dans les corps gras (1). Le pouvoir pénétrant et hémolytique du chloroforme et des essences (benzène, xylène, etc.) est probablement en rapport avec la même propriété.

Hémolyse par les sels biliaires, les savons et les acides gras. — Le pouvoir hémolytique très énergique de la bile est connu depuis fort longtemps ; il est dû aux acides biliaires. Le pouvoir varie avec les différents sels : il est plus énergique pour le cholate de soude que pour le glycocholate, plus grand encore pour le taurocholate, etc.

Lorsqu'on les fait agir en concentration suffisante, les sels biliaires dissolvent complètement les stromas globulaires ; aussi l'hémolyse qu'ils produisent est-elle énergique et rapide.

Les sels de sodium des acides gras, en particulier l'oléate de soude, ont une action hémolytique qui ressemble à celle des sels biliaires. Cette action hémolysante est empêchée par le sérum-albumine et par les sels de chaux. Un mélange neutre (inactif) de sérum-albumine-oléate de soude est réactivé par l'addition de traces d'acide oléique. Ce mélange réactivé perd son pouvoir hémolytique à 56° ; une petite addition d'oléate de soude le lui rend. Ces phénomènes ressemblent à ceux qu'on observe dans l'étude des sérums hémolytiques.

Hémolyse par les glycosides. — Certains glycosides (saponine, solanine, digitaline, etc.) ont une action hémolytique très intense. Cette action est infiniment plus énergique sur les globules en suspension dans l'eau salée que sur ceux qui sont encore contenus dans leur propre plasma. Cette action protectrice du sérum est probablement due ici à la cholestérine, car l'addition de cholestérine à l'émulsion globulaire protège les hématies contre l'action hémolytique de la saponine (2).

D'après les recherches de *Mayer* et *Schaeffer*, les hématies riches en cholestérine, comme celles du bœuf et du mouton, sont aussi celles

exemple, des sels minéraux. Mais pour expliquer la pénétration des substances solubles dans les lipoïdes, il n'est pas nécessaire d'admettre que ces derniers soient disposés en une membrane. Les alcools, éthers, les alcalis, les sels biliaires, etc., qui dissolvent les lipoïdes, sont par suite capables de détruire le complexe formé par le pigment sanguin avec les lipoïdes et les albuminoïdes du stroma.

(1) Fuhner et Neubauer, *Zentralblatt f. Physiologie*, XX, 1906.

(2) Pohl, *Arch. int. Pharm. et Ther.* 1900 et 1901 ; — Hédon, *Archives int. de pharm.*, 1901 ; — Ransom, *Deutsche med. Woch*, 1901.

qui résistent le mieux à l'action hémolytique de la saponine qui remplirait ainsi son rôle protecteur aussi bien dans les globules que dans le sérum. Certaines recherches tendent à faire supposer que la lécithine des globules joue un rôle opposé et détermine l'hémolyse par la saponine, mais cette question n'est pas encore résolue.

L'hémolyse par la saponine a été appliquée à l'étude clinique de la résistance globulaire (1). Les résultats obtenus sont différents de ceux que l'on obtient pour la résistance aux solutions salines hypotoniques. Dans les anémies graves, la résistance à la saponine reste normale dans les cas où elle est diminuée pour les solutions salines. Dans les ictères hépatiques, on observe souvent une diminution de résistance à la saponine alors que dans les ictères hémolytiques, elle est normale et coïncide avec une fragilité plus grande des hématies vis-à-vis des solutions salines. Dans l'ictère toxique expérimental obtenu par la toluylène-diamine, il semble y avoir une diminution de résistance à la fois vis-à-vis des solutions salines et vis-à-vis de la saponine.

HÉMOLYSE PAR LES DIASTASES, LES TOXINES ANIMALES VÉGÉTALES ET MICROBIENNES

Un grand nombre de diastases, de toxines animales et microbiennes, ont une action hémolytique. La nature chimique de ces substances étant à peu près inconnue, leur étude forme un lien de passage tout naturel à celle des hémolysines des sérums.

L'action du suc pancréatique a été étudiée par *Delezenne* (2). Le suc pancréatique inactif retiré de la glande du chien par cathétérisme n'est pas hémolytique ; le suc intestinal retiré par fistule ne produit que l'agglutination des hématies ; mais le mélange des deux sucs produit une hémolyse intense et rapide. Ces faits présentent une certaine analogie avec ceux qu'on observe dans l'étude des sérums hémolytiques. Le mode d'action de la trypsine inactive et de la kinase sur les hématies rappelle celui de l'alexine et de la sensibilisatrice des sérums.

La présence d'hémolysines a été mise en évidence dans les cultures d'un très grand nombre de microbes. C'est surtout la toxine staphylococcique (3) et la toxine tétanique (4) qui ont été méthodiquement

(1) May, Th. Paris, 1914.
(2) Delezenne, *S. de Biologie*, 7 février 1903.
(3) Van de Velde, *la Cellule*, 1894 ; — Schur, *Beiträge z. chem. Phys. u. Path.*, 1903.
(4) Madsen, *Zeitschrift f. Hygiène*, XXXII, 1899 ; — Arrhenius et Madsen, *Zeitschrift f. physik. Chemie*, 1903.

étudiées à ce point de vue. Le sérum de l'animal vacciné contient une antitoxine qui *in vitro* empêche l'action hémolysante de la toxine ; cette antitoxine fixe *in vitro* l'hémolysine. Le sérum normal, l'ovalbumine, ont une action empêchante. Le chlorure de calcium a une action favorisante (1).

Les graines de certaines plantes abandonnent à l'eau et aux solutions salines des substances dont la nature chimique n'est pas déterminée et qui, par leur action sur l'organisme, ressemblent aux toxines microbiennes. Elles sont en effet très toxiques pour les Mammifères et, de plus, on peut vacciner ces animaux contre leur action : leur sérum devient alors antitoxique. Les principales de ces substances sont la ricine (2), l'abrine (3), et la robine (4).

Mises en présence de globules rouges, les toxines végétales produisent d'abord une agglutination énergique. Si par agitation on désagrège les amas, le liquide se teinte en rouge. On peut immuniser les mammifères contre cette action : le sérum des animaux immunisés neutralise *in vitro* les effets de la toxine ; le mélange de toxine et de sérum antitoxique est inoffensif pour l'animal auquel on l'injecte, et ne possède plus d'action sur les globules rouges.

Un grand nombre de poisons d'origine animale (venin de crapaud, de scorpion, etc.), ont été étudiés au point de vue de leur action hémolytique, mais de tous, le mieux connu est le venin de cobra (5). L'injection à l'animal d'un mélange de toxine (venin) et d'antitoxine (antivenin de Calmette), reste inactif ; le mélange *in vitro* est dépourvu de propriétés hémolytiques. La présence du plasma semble nécessaire pour obtenir l'hémolyse. Les globules rouges centrifugés et lavés, puis mis en suspension dans l'eau salée isotonique, ne subissent pas l'hémolyse par le venin ; mais l'addition de sérum sanguin frais aux globules lavés suffit à provoquer le phénomène. Il semble donc y avoir dans le sérum une substance adjuvante. Cette substance doit exister aussi dans les stromas puisque le produit du laquage de globules lavés de cobaye favorise l'hémolyse, comme le fait le sérum sanguin. Cette substance favorisante, existant à la

(1) Vincent, Dopter et Billet, *S. de Biologie*, 3 mars 1906.

(2) Retirée des graines du Ricin (Kobert).

(3) Retirée des graines de l'Abrus precatorius (Kobert).

(4) Extraite de l'écorce du Robinia pseudo-acacia (Kobert). Des toxalbumines hémolytiques ont été aussi extraites de certains champignons. Le chauffage diminue légèrement l'action *in vitro* des solutions d'abrine et de ricine (Olmer et Sauvan, *R. biologique de Marseille*, 15 mars 1910).

(5) Stephens et Myers, *J. of Path. and Bact.* 1898 ; — Kyes, *Berliner Klin. Woch.*, 1902 et 1903 ; — Kyes et Sachs, *Berliner klin. Woch.*, 1903 ; — Flexner et Noguchi, *J. of exp. med.*, 1902 ; — Phisalix, *S. de Biologie*, 26 juillet 1902 ; — Noc, *Annales Pasteur*, 1904 ; — Calmette, *C. R. Ac. de sc.* 16 juin 1902 ; *Les venins*, Paris 1907.

fois dans le sérum et dans les globules est la lécithine, avec laquelle *Kyes* a pu reproduire toutes les expériences de réactivation du venin de serpent. Cette action adjuvante si curieuse de la lécithine a été comprise de diverses façons. Pour *Kyes*, elle était due à la formation de complexes nouveaux formés par l'union de la lécithine et du venin (lécithides). Pour *Arrhénius* (1), la lécithine intervenait en modifiant les conditions de la solubilité des substances hémolytiques ; c'est ce qui expliquait ses effets différents suivant les cas : elle favorise en effet l'hémolyse par les acides, et elle gêne l'hémolyse par la saponine. *Delezenne* et *Ledebt*, en opérant, non plus sur la lécithine isolée, mais sur le vitellus de l'œuf frais, ont montré que le venin exerçait sur la lécithine une action diastasique. L'action hémolytique est due à la transformation de la lécithine, sous l'influence du venin de cobra, en un phosphatide hémolysant (lysocithine) et non à une combinaison de lécithine et de venin (lécithide) comme le croyait *Kyes* (2).

HÉMOLYSE PAR LES SÉRUMS

L'hémolyse par les sérums est celle qui a posé les problèmes biologiques les plus intéressants et qui a eu les applications cliniques les plus importantes. Le point de départ de nos connaissances sur ce sujet se trouve dans les travaux de *Landois* sur la transfusion du sang. Il examinait au microscope des mélanges divers de globules d'espèces différentes avec des sérums d'autres espèces : il constatait l'action nocive de certains sérums sur des globules étrangers. Cette action variait avec les espèces : ainsi, le sérum de chien paraissait en général très nocif tandis que celui du cheval l'était beaucoup moins. Au microscope, on voyait les hématies se gonfler, perdre leur hémoglobine ; souvent elles s'agglutinaient avant d'être détruites.

Les sérums normaux sont en effet plus ou moins hémolytiques pour les globules rouges d'espèce étrangère ; les exceptions concernent seulement les espèces voisines (lièvre et lapin ; âne et cheval ; rat et souris, etc.). Ainsi, le sérum humain hémolyse les globules des

(1) Arrhénius, *Ergebnisse der Physiologie*, 1908.

(2) Delezenne et Ledebt, *C. R. de l'Ac. des sc.*, 20 mars et 3 juillet 1911, 25 novembre 1912. Le phosphatide hémolysant a été isolé (voir Delezenne et Fourneau, *Bull. de la S. chimique de France*, XV, 1914). La transformation de la lécithine sous l'influence du venin de cobra se fait suivant les lois ordinaires des actions diastasiques, c'est-à-dire qu'il suffit de très peu de venin pour la produire. Le venin, après avoir agi sur la lécithine pour la transformer, peut être récupéré du mélange et manifester à nouveau son action diastasique.

singes et des lémuriens tandis qu'il laisse intacts ceux des anthropoïdes (gibbon, orang, chimpanzé) qui sont, par leurs caractères zoologiques, plus voisins de lui.

Plus tard, les travaux de *Bordet* (1) ont montré la possibilité de faire apparaître chez les animaux des propriétés hémolytiques nouvelles dans leur sérum. Ces hémolysines ont été appelées *hémolysines acquises* par opposition aux premières qui sont les *hémolysines naturelles* ou *hémolysines des sérums normaux*.

Technique pour l'étude des sérums hémolytiques (2). On emploie le sérum de caillot. Le sang de bœuf, de porc, de cheval, de mouton, est recueilli aux abattoirs dans des tubes stériles, dans lesquels on le laisse coaguler. Le sang de cobaye, lapin, chat, chien, est prélevé au laboratoire, par saignée aseptique de la carotide (voir ch. VIII). Les sérums sont décantés.

Pour récolter les globules, le sang est défibriné aseptiquement dans des ballons contenant des perles de verre, filtré sur coton de verre stérilisé et centrifugé aseptiquement. Après décantation du sérum, les globules sont lavés trois fois aseptiquement, par centrifugation dans l'eau salée à 9 p. 1.000 stérilisée. L'eau salée surnageant étant décantée, les globules peuvent être conservés à la glacière; mais on s'arrange de telle sorte que sérum et globules soient toujours employés dans les ving-quatre heures qui suivent la récolte.

Les expériences sont conduites aseptiquement et toujours dans les mêmes conditions. Les purées de globules sont faites à 5 p. 100 dans l'eau salée à 9 p. 1.000. Chaque expérience comprend au moins 6 tubes contenant chacun 5 centimètres cubes de l'émulsion globulaire. On ajoute des quantités croissantes du sérum à essayer : par exemple, 1, 2, 3, 5, 7, 10 dixièmes de centimètre cube. Les tubes sont agités et mis à l'étuve à 38°. Deux heures après ils sont agités de nouveau, pui abandonnés dans un endroit frais et examinés ensuite 12 heures après. Dans chaque expérience, on prépare des tubes témoins avec des globules de même espèce, auxquels on n'ajoute pas de sérum et qu'on place dans les mêmes conditions que les autres.

Le degré de l'hémolyse est évalué en quantité d'hémoglobine diffusée. Le dosage est fait au colorimètre, ou par comparaison avec des étalons fabriqués extemporanément. On hémolyse 5 centimètres cubes de globules de l'espèce considérée dans 100 centimètres cubes d'eau distillée. On obtient ainsi la teinte correspondant à l'hémolyse totale pour une émulsion à 5 p. 100. Des dilutions appropriées permettent d'obtenir une série de teintes correspondant à une hémolyse partielle (5, 10, 20 p. 100, etc., de l'hémolyse totale). Ces solutions sont réparties dans des tubes identiques à ceux dans lesquels l'expérience est faite. La comparaison est facile.

Propriétés hémolytiques des sérums normaux. — L'action hémolytique des sérums normaux s'exerce à petites doses, en milieu

(1) Bordet, *Annales Pasteur*, 1898-1899.

(2) Cette technique peut naturellement subir des variantes. Celle que nous donnons est empruntée à Mayer et Schaeffer (*J. de Physiologie gen. et de Path.*, 1911).

salé isotonique. Cette propriété disparaît par le chauffage à 56° pendant une demi-heure (1).

Si, d'une manière générale, un sérum hémolyse les globules d'une espèce étrangère, il existe de très grandes différences entre les espèces (2). Ainsi, par exemple, le sérum de cheval n'a presque aucun pouvoir hémolytique et agglutine seulement un peu les globules du cobaye; les sérums de mouton et de bœuf hémolysent seulement les globules de cobaye et de lapin ; les sérums de porc et de chien hémolysent les globules de cobaye, de porc, de mouton, etc. Il y a un ordre de résistance des globules qui varie suivant le sérum considéré et qui par exemple, vis-à-vis du sérum de porc est dans l'ordre suivant, décroissant : cobaye, lapin, mouton, cheval, chien, bœuf; les globules du cobaye et du lapin sont beaucoup plus hémolysés que les autres. Cet ordre de résistance varie avec les autres sérums; cependant les globules du lapin et du cobaye se trouvent toujours parmi les moins résistants, les globules du chien et du porc parmi les plus résistants.

Il y a donc un ordre d'activité entre les différents sérums et un ordre de résistance des globules, que l'on peut résumer dans le tableau suivant, emprunté à *Mayer* et *Schaeffer*.

Globules de	hémolysés par les sérums de				
Porc					*Chien*
Chien				Porc	
Bœuf				Porc	Chien
Mouton			Lapin	Porc	Chien
Cheval		Aggl. Bœuf		Porc	Chien
Lapin	Aggl. cheval	Bœuf		Porc	Chien
Cobaye	Aggl. Cheval	Bœuf	Lapin	Porc	Chien

De cette manière de grouper les faits découle aussitôt une hypothèse : on peut supposer qu'il existe dans les divers sérums un même agent hémolytique, présent en concentration plus ou moins grande. Les analyses chimiques des globules et du sérum montrent en effet que certains constituants varient dans l'ordre de résistance des globules et dans l'ordre de puissance des différents sérums hétérogènes (3). Ainsi, l'ordre de puissance des différents sérums est le suivant : cobaye, cheval, bœuf, lapin, porc, chien. Or le taux de cholestérine du

(1) Darenberg, *S. de Biologie*, 24 octobre 1891.

(2) Stern. *S. de Biologie*, 1904, p. 309 ; — Rissling, *Centralblatt f. Bakteriologie.*, XLIV. 1907 ; — Hirschfeld, *Archiv f. Hygiene*, LXIII, 1907 ; — Mayer et Schaeffer, *J. de Physiologie et de Path. gen*, juillet 1911.

(3) Mayer et Schaeffer, *C. R. Ac. des sc.*, 14 octobre 1912, et *J. de Physiologie et de Path. gen.* XV, septembre 1913.

sérum varie à peu près dans le même ordre : il est de 0,383 p. 100 chez le cobaye, de 1.182 chez le bœuf, de 1.371 chez le chien ; et si l'on prend des sérums hétérogènes beaucoup plus actifs en s'adressant à d'autres vertébrés que les mammifères, le résultat sera encore plus frappant : le taux de cholestérine est de 1.700 chez la poule, de 2.411 chez la murène et de 6.836 chez l'anguille.

L'ordre de résistance des hématies des différentes espèces est en croissant : cobaye, lapin, cheval, mouton, bœuf, porc, chien, poule. Or il se trouve dans les globules un élément qui varie dans le même ordre : ce sont les acides gras non volatils (1). Ces résultats permettent de penser que l'hémolyse par les sérums hétérogènes n'est pas due à des corps spécifiques, mais qu'elle est due à des agents identiques, variant quantitativement ; le degré du pouvoir hémolysant dépendant seulement, d'une part de la résistance globulaire et d'autre part, du degré de concentration de cet agent dans le sérum. Les différences d'action s'expliqueraient ainsi par des variations quantitatives et non qualitatives.

Distribution des hémolysines naturelles dans la série animale. Sérum des Murénides. Influence de l'âge. — Les hémolysines naturelles ne semblent pas exister chez les Invertébrés. Elles apparaissent chez les Poissons et c'est chez eux qu'on trouve les plus énergiques. Il faut, en effet, faire une place à part au sérum des Murénides à cause de l'intensité de son pouvoir hémolytique et parce qu'il a été l'objet d'une étude approfondie (2).

Le sérum d'anguille, même à très faibles doses, provoque, en solution salée isotonique, l'hémolyse rapide des globules de cobaye. Cette propriété disparaît après un court chauffage à 58° (3).

Camus et *Gley* ont montré qu'on peut immuniser les animaux contre l'action du poison en leur injectant, soit l'ichtyotoxine active (sérum neuf), soit le sérum chauffé à 58°. Dans ces deux cas, le sang des animaux vaccinés ne subit plus l'hémolyse et leur sérum possède

(1) Le taux de cholestérine étant relativement faible dans les globules et variant peu, le coefficient lipocytique, facteur d'imbibition, diminue progressivement et suivant l'ordre de résistance croissante. Le pouvoir hémolytique du sérum varie comme le taux de cholestérine ; la résistance des globules varie comme le taux d'acides gras non volatils. L'augmentation de la cholestérine dans le sérum, la diminution des acides gras dans le globule, augmentent le coefficient lipocytique du complexe sérum-globules et favorisent l'hémolyse.

(2) L. Camus et Gley, *C. R. Ac. des sc.*, 31 janvier 1898 ; *Archives. int. de Pharmacodynamie*, V, 1898, et *Recherches sur l'action physiologique des Ichtyotoxines*, Paris, 1912.

(3) Le sérum d'anguille chauffé à 56° ne peut être réactivé ; la substance toxique de ce sérum, d'après la théorie de Bordet, serait donc simple.

une propriété antitoxique très nette. L'absence d'hémolyse chez les animaux qui ont été vaccinés avec l'ichtyotoxine chauffée est due aux propriétés antitoxiques acquises par le sérum.

Chez les animaux vaccinés avec le sérum d'anguille frais, l'absence d'hémolyse est due, à la fois, aux propriétés antitoxiques de leur sérum, mais aussi à la résistance plus grande de leurs globules au poison ; cet accroissement de résistance manque totalement chez les animaux qui ont reçu l'ichtyotoxine chauffée. Le sang des animaux qui ont été vaccinés avec le sérum frais résiste donc encore mieux au poison que celui des animaux simplement vaccinés avec le sérum chauffé.

Chez les Mammifères, un certain nombre d'observateurs ont signalé des différences entre le sang des jeunes et le sang des adultes au point de vue de la présence et de l'énergie des hémolysines naturelles. D'une manière générale, le sérum des jeunes semble avoir des propriétés hémolytiques moins importantes que le sérum de l'adulte. Ces propriétés seraient donc, dans une certaine mesure, acquises, et on a supposé, avec plus ou moins de vraisemblance, que cette acquisition humorale représentait une réaction à des causes extérieures.

Hémolysines acquises. — On peut faire apparaître expérimentalement dans le sérum des animaux des propriétés hémolytiques qui n'y existent pas normalement. La connaissance de ces propriétés hémolytiques nouvelles, ou, comme on dit, de ces hémolysines acquises, date des travaux de *Bordet* qui ont eu eux-mêmes leur point de départ dans l'étude des propriétés bactéricides des humeurs (1).

Bordet part du phénomène de Pfeffer, c'est-à-dire de la destruction des vibrions cholériques par les humeurs du cobaye vacciné. *Pfeffer* obtenait le phénomène *in vivo*. *Bordet* montre qu'on peut l'obtenir *in vitro*, par l'action directe sur les microbes du sérum de l'animal vacciné : le sérum spécifique produit la mort et l'agglutination des vibrions. Si ce sérum est chauffé à 55-56° pendant une demi-heure, il perd son activité, mais si on ajoute au sérum chauffé du sérum frais d'animal neuf (sérum par lui-même inactif), le sérum chauffé retrouve de nouveau la propriété d'agglutiner et de détruire les vibrions ; il a été, comme on dit, « réactivé ». *Bordet* suppose alors

(1) Bordet, *Annnales de Pasteur*, 1898, 1899, 1900, 1901 ; — Metchnikoff, *l'Immunité*, Paris, 1901 ; — Ehrlich et Morgenroth, *Berliner Klin. Woch.* 1899, 1900, 1901 ; — Ehrlich, *Schlussbetrachtungen*, in Nothnagel, *Spec. Pathologie*, 1901 ; — Bordet, *Traité de l'immunité*, Paris, 1920 et Fixation de l'alexine in Gilbert et Weinberg, *Traité du sang*, II, 1921.

que le phénomène est dû à l'action de deux substances différentes : l'une, spécifique, appartenant au sérum des vaccinés, résistant à la chaleur, inactive seule, mais capable d'une action intense lorsqu'elle est associée à la seconde : c'est la *sensibilisatrice ;* la seconde, non spécifique, détruite par la chaleur, n'ayant qu'une activité très faible lorsqu'elle est seule, mais capable d'agir énergiquement lorsqu'elle est associée à la première ; c'est l'*alexine*. La véritable substance bactéricide, c'est l'alexine du sérum normal ; mais son action, extrêmement faible, est renforcée par la substance spécifique qui agit comme un mordant, d'où son nom de sensibilisatrice.

Ces faits nouveaux avaient, comme nous l'avons vu (ch. VII), une importance considérable au point de vue des théories de l'immunité en ce qu'ils montraient dans les humeurs, dans le sang, l'apparition de propriétés bactéricides, en dehors de l'intervention des leucocytes, considérés encore, à ce moment, comme les seuls agents de la destruction des microbes.

Dans le but d'étudier le mode d'apparition de ces nouvelles propriétés humorales, *Bordet*, au lieu d'injecter des cultures microbiennes pour obtenir un sérum destructeur de microbes, eut l'idée d'injecter des globules rouges pour obtenir un sérum destructeur d'hématies. Le résultat combla ses espérances, et il obtint ainsi, par injection d'hématies étrangères, des sérums doués de propriétés hémolytiques nouvelles, acquises, spécifiques, plus énergiques encore que celles des sérums normaux.

Bordet fait à des cobayes 5 ou 6 injections intrapéritonales successives de 10 centimètres cubes de sang défibriné de lapin. Alors que le sérum de cobaye neuf est absolument inactif vis-à-vis des globules rouges du lapin, le sang de cobaye ainsi vacciné agglutine, puis hémolyse les hématies du lapin (1). Ce sérum perd son pouvoir hémolytique si on le chauffe à 55°, tout en restant agglutinant.

Si au mélange inactif formé de sérum chauffé et de globules de lapin, on ajoute un peu de sérum de cobaye neuf, la propriété hémolytique réapparaît et l'hémoglobine diffuse. L'addition de sérum a, comme on dit, réactivé le sérum préparé dont le pouvoir avait disparu par le chauffage.

Le pouvoir hémolytique nouveau, apparu par vaccination dans le

(1) Pour faire ces expériences, il vaut mieux injecter des globules en suspension dans l'eau salée. Les globules sont recueillis comme il a été indiqué plus haut à propos des sérums normaux. La purée de globules centrifugés est ramenée au volume primitif de l'échantillon de sang par adjonction d'eau salée stérile. On injecte cette émulsion aseptiquement dans le péritoine, à raison de 20 cc. (au lapin et au chat) ou 10 cc. (au cobaye) tous les cinq jours. On fait 5 ou 6 injections.

sang du cobaye, est limité aux hématies du lapin, par conséquent, paraît spécifique vis-à-vis de l'espèce globulaire qui servit à l'inoculation.

Des faits semblables peuvent être obtenus avec le sérum des autres animaux, par injection de globules de diverses espèces. Dans chaque expérience, le pouvoir hémolytique nouveau paraît, jusqu'à un certain point, spécifique vis-à-vis de l'espèce globulaire injectée. Par exemple, on obtient, à la suite de l'injection de globules de bœuf au lapin, un sérum de lapin qui hémolyse les globules de bœuf ou, comme on dit, un *sérum de lapin antibœuf* ou, plus simplement, un sérum de *lapin-bœuf*. On obtiendra, de la même façon, un sérum de *lapin-cheval*; un sérum de *lapin-mouton*, etc.

Les expériences faites par *Bordet* avec les globules rouges donnaient donc exactement les mêmes résultats qu'avec les microbes ; il leur appliqua tout naturellement la même interprétation : la propriété hémolytique nouvelle était le résultat de l'action de deux substances, l'une, spécifique, résistant à la chaleur, apparue dans le sérum de l'animal vacciné, la *sensibilisatrice* (1), l'autre, non spécifique, détruite par la chaleur, existant dans le sérum de l'animal neuf, l'*alexine* (2).

Origine des hémolysines. — La propriété hémolytique acquise appartient au sérum sanguin (3). Elle peut être considérée comme une réaction humorale analogue à celle qui se manifeste sous la forme de propriétés bactéricides ou antitoxiques à la suite de l'injection de microbes ou de toxines dans l'organisme.

Les idées sur l'origine des hémolysines ont donc subi le contre-coup des discussions qui ont eu lieu sur l'origine des anticorps. Pour les uns, l'anticorps est une réaction de tout l'organisme ; pour d'autres, il est la réaction d'une cellule en particulier. Pour *Metchnikoff*, il est la réaction du phacocyte qui a absorbé et digéré l'antigène, le globule rouge dans le cas qui nous occupe. L'alexine provient du leucocyte qui la met en liberté pendant la coagulation, par sa destruction, ce qui est peu probable (voir ch. VIII), puisque le leucocyte ne se détruit pas pendant la coagulation et que l'alexine préexiste dans le plasma (4).

Les idées de *Metchnikoff* sur l'origine exclusivement leucocytaire des anticorps devait naturellement le porter à les rechercher dans les organes lymphoïdes. En fait, au cours de l'immunisation, on a vu quelquefois apparaître l'anticorps spécifique (sensibilisatrice) dans la moelle osseuse, dans la rate, etc., à un moment où il n'était pas encore présent dans le sang. Mais les travaux qui ont été faits dans cette direction, surtout au point de vue des substances hémolytiques, n'ont donné que des résultats négatifs ou douteux. Ces résultats sont encore troublés

(1) Ambocepteur, anticorps.

(2) Complément d'Ehrlich.

(3) Les anticorps existent aussi dans les sérosités, dans le lait, l'urine ; l'humeur aqueuse et le liquide céphalo-rachidien en contiennent peu ou pas.

(4) Il faut alors admettre que l'alexine est mise en liberté par un acte de sécrétion.

par la petite quantité de sang qui subsiste dans les organes servant aux extraits et aussi par les produits d'autolyse (acides gras, savons, etc.) qui ont par eux-mêmes, comme nous l'avons vu, des propriétés hémolytiques. Il est bien probable que ces réactions humorales ne sont pas limitées aux leucocytes ni au tissu lymphoïde ; peut-être, les tissus de mésenchyme, en raison de leur spécialisation fonctionnelle moindre, y prennent-ils seulement une part plus importante que les autres tissus. L'origine des anticorps hémolytiques (hémolysines acquises) n'est donc pas encore connue (1).

Antihémolysines. — En étudiant l'hémolysine naturelle du sérum d'anguille, nous avons vu qu'en 1898, *Camus* et *Gley*, *Kossel*, avait réussi à vacciner des animaux contre cette action, en leur injectant des doses croissantes de ce sérum. Le sérum des animaux immunisés a des propriétés antitoxiques, antihémolytiques. *Bordet*, de la même manière, en injectant au lapin du sérum de poule, a obtenu une antitoxine (antihémolysine) analogue à celle obtenue par *Camus* et *Gley;* le sérum du lapin immunisé empêche l'action hémolytique du sérum de poule sur les différentes espèces d'hématies dont il provoque la destruction dans les conditions habituelles. *Bordet* a pu aussi obtenir, non plus une antihémolysine contre une hémolysine naturelle, mais un anticorps empêchant l'action d'une hémolysine acquise. Il provoque chez le cobaye, par injection de globule de lapin, la formation d'un sérum hémolysant les globules du lapin. Ce sérum de cobaye, contenant l'hémolysine acquise, est inoculé à un lapin neuf : on provoque dans le sérum de ce lapin l'apparition d'un pouvoir empêchant vis-à-vis de l'hémolysine acquise (sérum de cobaye-globules de lapin).

Isolysines. — *Bordet* eut l'idée de modifier les propriétés du sérum d'un animal en lui injectant dans le péritoine, le sang d'un individu de même espèce, espérant ainsi obtenir un pouvoir hémolytique vis-à-vis du sang de la même espèce, une *isolysine*. Mais les résultats furent négatifs. *Ehrlich* et *Morgenroth* reprenant ces expériences, injectèrent à la chèvre, non plus du sang ou des globules de chèvre, mais du sang laqué de chèvre, du sang dans lequel les globules avaient subi une destruction, une hémolyse préalable ; ils espéraient avoir ainsi une absorption et, par suite, une réaction plus facile. Le résultat confirma cette prévision. Le sérum de l'animal inoculé dans ces conditions, acquit la propriété d'hémolyser les globules rouges de *certaines* chèvres ; mais il n'hémolysait ses propres globules, ni *in vivo* (hémoglobinurie), ni *in vitro*. Il y avait eu production d'*isolysine*, le terme d'*autolysine* désignant le sérum qui hémolysera les propres globules de l'individu vacciné.

Ascoli (2), *Camus* et *Pagniez* (3), *Troisier* et *Weissenbach* (4) ont observé, dans certains états pathologiques, chez l'homme, l'apparition dans le sérum, d'un pouvoir isolytique, c'est-à-dire hémolytique vis-à-vis des hématies d'autres individus humains.

Autolysines et hémoglobinurie paroxystique. — Certains auteurs avaient déjà attribué les accès de destruction globulaire de l'hémoglobinurie

(1) Bordet, *Immunité*.
(2) Ascoli, *Clinica medica*, 1901.
(3) J. Camus et Pagniez, *Arch. int. de Pharmacodynamie*, 1902 ; — Pagniez, Th. Paris 1902.
(4) Troisier, Th. Paris, 1910 et *J. méd. français*, 1920 ; — Weissenbach, Th. Paris, 1915.

paroxystique à l'existence d'antolysines dans le sang. *Donath* et *Landsteiner* (1), *Widal* et *Rostaine*, *Widal*, *Abrami* et *Brissaud* (2) ont montré, dans le sérum des malades atteints de cette affection, l'existence d'un anticorps hémolytique qui présente la particularité d'être fixé par les hématies de ces malades quand on le fait agir sur leurs globules à des températures basses (0 à 10°). L'hémolyse a lieu quand le mélange, préalablement refroidi, est replacé à 37°. *Widal* et *Rostaine* pensent que cette autolysine est normale, qu'elle existe à l'état de santé ; ce qui, d'après eux, caractérise l'hémoglobinurie, c'est l'absence d'une antihémolysine normale. *Widal* considère avant tout la crise hémoglobinurique comme une dislocation subite par le froid du complexe hémolytique contenu dans le sang de tous les sujets (3).

Théories de l'hémolyse par les hémolysines acquises. — L'hémolyse par les sérums hémolytiques ne peut être attribuée à la pression osmotique, à un défaut d'isotonie, car les sérums agissent énergiquement à petites doses, en milieux isotoniques. Elle est donc le fait d'une toxicité spéciale du sérum sur le globule.

Pour *Bordet*, l'hémolyse est le résultat de l'action de deux substances : l'une, *l'alexine* (complément) est la substance qui a en réalité le pouvoir toxique, le pouvoir hémolytique. Elle existe déjà dans le sérum normal où, en général, son pouvoir est peu énergique ; elle est facilement altérée par la chaleur ; elle n'est pas spécifique. L'autre, la *sensibilisatrice* (anticorps, ambocepteur), résistant à la chaleur, est spécifique ; elle permet à l'alexine d'agir, elle affaiblit le globule. Elle modifie la cellule de manière à lui permettre d'absorber l'alexine. Elle joue ainsi le rôle d'adjuvant (4). La production de l'anticorps spécifique est la réponse à une excitation spécifique ; cette excitation est produite par les cellules injectées. Dans le cas de l'anticorps microbien, c'est le microbe qui est le générateur d'anticorps, c'est-à-dire l'antigène. Dans le cas de l'hémolyse, c'est le globule rouge injecté qui est l'antigène. Dans le globule rouge, ce n'est pas l'hémoglobine qui constitue l'antigène, car si on injecte l'hémoglobine, on n'obtient aucun résultat ; si, au contraire, on injecte les stromas, on obtient l'anticorps, exactement comme avec les globules entiers. L'anticorps et le complément se fixent sur le stroma décoloré, comme sur l'hématie intacte. Un même sérum peut contenir plusieurs substances spécifiques distinctes ; un animal peut être immunisé vis-à-vis de plusieurs espèces globulaires ; son sérum possède donc autant de substances spécifiques qu'il y a d'espèces globulaires. Au contraire, une quantité suffisante d'hématies, chargées d'anticorps, enlève toujours à n'importe quel milieu la totalité de son complément, expérience qui semble plutôt en faveur de l'unicité du complément.

Pour *Ehrlich*, les phénomènes qui interviennent ici sont de véritables réactions chimiques. L'hémolyse résulte de la combinaison de trois facteurs : le protoplasma de l'hématie (antigène), — l'ambocepteur (sensibilisatrice), — le complément

(1) Donath et Landsteiner, *Zeitschrift f. klin. Medicin*, 1906.

(2) Widal et Rostaine, *S. de Biologie*, 1905 et 1906 ; — Widal, Abrami et Brissaud, *S. de Biologie*, 1913.

(3) Widal, Abrami et Brissaud, *Presse médicale*, 1920, voir ch. xvi. Voir aussi Froin et Pernet, *S. de Biologie*, 17 janvier 1914.

(4) « L'action de la sensibilisatrice sur les éléments cellulaires serait donc comparable à celle de certains agents fixateurs ou mordançants, lesquels confèrent à certaines substances la propriété d'absorber des couleurs qu'elles refusaient auparavant » (Bordet, 1901).

(alexine). L'ambocepteur est le terme intermédiaire nécessaire entre le protoplasma et le complément. Il est donc d'une affinité bipolaire, d'où son nom. L'un des pôles s'adapte au protoplasma, l'autre fixe le complément. La fixation au protoplasma est d'ordre chimique ; elle se fait par l'intermédiaire d'un chaînon. La surface du protoplasma vivant, conçu comme un système chimique, comprend, pour *Ehrlich*, un noyau central hérissé d'une foule de chaînes latérales pourvues chacune d'affinités spécifiques. Ces chaînes se saturent au contact des éléments contenus dans le milieu. Chaque chaînon peut ainsi fixer chimiquement les substances pour lesquelles il a de l'affinité. Supposons l'ambocepteur fixé sur la cellule. S'il existe dans le liquide ambiant des molécules de complément libre, l'autre pôle de l'ambocepteur s'unit à ces molécules et l'hémolyse se produit. L'ambocepteur est l'intermédiaire obligé entre le protoplasma d'une part et le complément d'autre part.

Ehrlich a proposé des schémas qui sont simplement des illustrations d'hypothèses, c'est-à-dire une manière de faire comprendre une hypothèse par des images, dans lesquelles ces corps en présence s'adaptent les uns sur les autres et où les corps spécifiques sont comparés à des clés de formes variées, mais déterminées et spécifiques pour chaque serrure.

Comme on le voit, ces théories se contentent de synthétiser d'une manière très saisissante les résultats obtenus dans les expériences en attribuant les actions hémolytiques et favorisantes à des substances particulières se fixant les unes sur les autres. Elles ne nous donnent pas une idée de ce qui se passe effectivement dans ces réactions. C'est que ces dernières sont considérées comme *spécifiques*. A chaque antigène correspond un anticorps particulier, adapté d'une manière spécial à la constitution physico-chimique de l'antigène et de telle manière qu'il s'y adapte exclusivement, comme la clé qui ouvre une serrure compliquée, suivant la célèbre comparaison de *Fischer*. Les anticorps formés varieraient donc à l'infini.

En réalité, la spécificité des anticorps hémolytiques n'est pas absolue. La spécificité complète n'est qu'apparente : elle cesse lorsqu'on fait de longues expériences en série. Les propriétés hémolytiques acquises ne sont pas plus exclusives et spécifiques que celles des sérums normaux (1). Comme le montrent les résultats des expériences de *Mayer* et *Schæffer*, un sérum préparé n'hémolyse pas exclusivement les globules correspondant à l'antigène. Ainsi le sérum lapin-chien hémolyse surtout les globules du chien, mais il hémolyse encore beaucoup les globules du cobaye et du cheval, un peu les globules du porc et du mouton.

Ces faits avaient déjà été vus par les partisans de la spécificité qui les avaient interprétés en admettant la pluralité des anticorps. Si le sérum antichien agit aussi sur le cobaye et le cheval, c'est qu'à côté de l'anticorps principal (antichien), il renferme des anticorps accessoires (anticobaye, antichoval). Il est plus simple de supposer qu'il existe entre ces actions un élément commun qui varie quantitativement. Si l'on examine par exemple l'action des différents sérums sur les globules du cobaye, on voit que suivant d'ordre de leur intensité d'action décroissante, ils doivent être classés de la façon suivante : anticobaye, antichoval, antimouton, antichien, antibœuf. Or, ces rapports de voisinage des globules antigènes sont les mêmes que ceux que nous avons constatés en étudiant leur résistance. On est donc arrivé à penser qu'il existe un élément commun entre les globules antigènes et que cet

(1) Mayer et Schaeffer, *J. de Phys. et de Path. gén.*, juillet 1911.

élément croît quantitativement d'une espèce à l'autre. On doit donc s'attendre à ce qu'un sérum préparé, situé, comme intensité d'action, au milieu de la série, comme le sérum antimouton, agisse sur les différentes espèces, d'autant moins que l'espèce est plus éloignée dans la série. C'est ce que l'on constate en effet, au moins d'une manière approchée (1).

La spécificité n'a donc rien d'absolu ; elle n'est que relative. Des faits semblables ont été vus, du reste, pour le pouvoir agglutinant des sérums sur les bactéries.

Au lieu d'admettre des mélanges d'anticorps qualitativement distinctes pour expliquer les faits nombreux où la spécificité est toute relative, il vaut peut-être mieux penser qu'il s'agit de différences quantitatives qu'une analyse plus approfondie des phénomènes permettra de faire connaître. Comme pour les hémolysines naturelles, il y a un ordre de puissance des hémolysines acquises qui dépend de la nature des globules antigènes. Ici encore, le résultat est sous la dépendance de deux facteurs quantitatifs : facteur quantitatif de résistance et facteur quantitatif de puissance dépendant vraisemblablement des différences de concentration d'un ou plusieurs agents chimiques dans les globules et dans les sérums.

L'état physique dans lequel se trouvent les substances du plasma et du stroma globulaire a certainement ici beaucoup d'importance. Un seul et même anticorps peut se trouver dans le sérum à des états physiques différents, dans un état colloïdal variable pouvant aller de la suspension grossière jusqu'à la solution parfaite, les affinités de contact se modifiant avec ces états (2). Non seulement la nature chimique des corps en présence, mais aussi leur état et leurs propriétés physiques, interviennent.

Quels sont maintenant les agents chimiques qui entrent en jeu dans ces réactions ? C'est ce qu'on ne sait pas encore exactement. On a d'abord fabriqué des hémolysines en injectant le sang total défibriné ; on a obtenu ensuite les mêmes résultats en injectant des globules lavés, puis des globules privés d'hémoglobine, puis l'extrait éthéré de ces stromas ; nous verrons plus loin qu'on a pu obtenir des précipitines, c'est-à-dire des substances précipitant les albumines du sérum, en injectant *in vivo* des albumines animales ou végétales. Dans les sérums hémolytiques normaux, les recherches de *Mayer* et *Schæffer* incriminent surtout les lipoïdes et particulièrement les acides gras et la cholestérine. Mais l'action hémolytique est une grandeur additive qui dépend à la fois de l'intensité d'action du sérum et de la résistance des globules ; les précipitations des colloïdes du stroma qui déclanchent la diffusion de l'hémoglobine sont donc sous l'influence d'interactions extrêmement compliquées et délicates dont les conditions ne nous sont pas encore entièrement connues.

Les recherches que nous venons d'exposer ont eu le mérite de poser nettement le problème, qui est, en réalité, un problème d'immunité, dépassant de beaucoup le seul phénomène de l'hémolyse. En comprenant l'hémolyse par les sérums, non plus comme un ensemble de réactions chimiques sous l'influence de substances

(1) Les résultats précédents se rapportent aux sérums préparés de lapin. Si on prend un animal immunisé d'une autre espèce, chat, cobaye, par exemple, on obtient des faits du même ordre, mais avec des différences tenant à l'espèce immunisée et permettant un nouveau classement en série.

(2) On pourrait concevoir ainsi, dit Bordet (*Immunité*, 1920), pourquoi, sans pourtant contenir une foule d'entités chimiques distinctes, le sérum se comporte comme s'il recélait de très nombreux anticorps.

absolument spécifiques, mais avant tout comme un phénomène physico-chimique dont la spécificité est toute relative, nous pouvons déjà entrevoir des explications beaucoup plus satisfaisantes de certains faits, comme, par exemple, la réactivation des sérums hémolytiques chauffés par l'addition d'un sérum neuf. La perte de la propriété hémolytique par le chauffage est attribuée généralement à la destruction de l'alexine ; la réactivation est expliquée par l'intervention d'une deuxième substance (sensibilisatrice) résistant à la chaleur. Mais l'étude de l'action de la chaleur sur les solutions colloïdales d'albumine suggère une explication plus simple dans laquelle n'interviennent que des changements d'état physique. En observant directement à l'ultramicroscope des solutions colloïdales d'albumine, on voit, à la suite du chauffage, les granules se grouper en amas plus volumineux qui, si l'action de la chaleur a été ménagée, peuvent rester dans cet état et conserver leurs mouvements browniens (1). Ce n'est que par un chauffage plus intense qu'on voit apparaître des flocons. De la même manière, un sérum qui a été chauffé à 56° donne, avec l'hydrate de fer colloïdal, une précipitation bien plus intense qu'avant le chauffage, comme si le chauffage avait augmenté le volume des granules. On peut supposer que la perte de la propriété hémolytique est conditionnée par ce changement d'état physique. L'addition d'un sérum neuf pourra rendre à ce sérum chauffé ses propriétés premières : en effet, l'addition de certains colloïdes à des solutions colloïdales est capable de dissocier les amas de granules (2). Suivant cette conception, il ne serait pas impossible de trouver des substances définies capables de réactiver un sérum chauffé, c'est-à-dire de jouer le rôle de l'alexine. Ce que nous avons dit plus haut de l'action des lipoïdes sur la réactivation du venin de cobra est en faveur de cette hypothèse.

Fig. 272. — Sang de salamandre traité par une solution de sublimé acétique. Hématie colorée par l'hématoxyline ferrique. Membranes formées par la précipitation des albuminoïdes du stroma et limitant des logettes contenant les lipoïdes qui gonflent et tendent à s'échapper. La strie bordante est visible ; elle limite le contour de l'hématie. 940 diam.

Quant au mécanisme intime de la diffusion de l'hémoglobine que provoquent les sérums hémolytiques, il n'est pas connu. Lorsqu'on examine au microscope les globules rouges en présence de ces hémolysines, on les voit se transformer en petites sphères, comme dans les solutions salines hypotoniques ; l'hémoglobine diffuse sans que le globule augmente ensuite de diamètre ; il n'y a ni éclatement ni rupture. Cependant, les faits paraissent un peu plus compliqués que dans l'hémolyse par l'eau distillée ; les stromas sont plus touchés. A la suite de l'hémolyse par l'eau distillée, les stromas paraissent simplement décolorés ; ils sont encore sensibles aux influences osmotiques. Traités secondairement par les solutions salines fortement hypertoniques, ils perdent de l'eau, ils se crispent, s'aplatissent. Traités de la même façon après l'hémolyse par les sérums, ils gardent leur forme sphérique (3).

Il semble donc y avoir des degrés dans l'action des substances hémolytiques

(1) A. Mayer, *S. de Biologie*, 6 et 20 juillet 1907.

(2) Cernovodeanu et V. Henri, *S. de Biologie*, 20 mai 1905 ; — V. Henri, *Semaine médicale*, 4 septembre 1907.

(3) Bordet, *Immunité* ; — Froin, *S. de Biologie*, 23 mai 1914.

sur le globule. Dans l'hémolyse par l'eau distillée, le stroma se décolore, il est relativement peu touché ; il est plus atteint avec les hémolysines ; avec certains corps enfin, comme les sels biliaires, à concentration suffisante, il semble lui-même se dissoudre. C'est qu'en effet de nombreux facteurs sont capables d'intervenir dans l'hémolyse.

Comme nous venons de le voir, le progrès de nos connaissances sur les colloïdes et l'état colloïdal nous ont permis de donner de l'hémolyse des explications plus approfondies. Les interprétations proposées à ce sujet ont toujours été conformes aux hypothèses faites sur la constitution intime du globule rouge ; et ces dernières se sont modifiées aussi suivant les progrès de nos connaissances sur l'hémolyse. Après avoir, pendant des années, vu surtout les phénomènes osmotiques et considéré l'hématie comme une vésicule à paroi semi-perméable, à contenu hémoglobique, on a envisagé d'une manière beaucoup plus générale les phénomènes d'hydratation et d'imbibition agissant sur la membrane de l'hématie, formée de substances à l'état colloïdal, ou sur une hématie constituée entièrement par une masse de colloïdes ; et l'on a étudié les conditions physiques et chimiques de cette hydratation. Mais les faits que nous avons examinés dans les pages précédentes ne sont certainement pas les seuls qui entrent en jeu dans ces phénomènes. Lorsqu'on cherche à expliquer l'hémolyse, beaucoup de facteurs doivent être considérés. Dans l'hématie des Mammifères, le stroma, ou support du pigment respiratoire, peut être envisagé comme une charpente réticulée, spongieuse, plus serrée à la périphérie et douée d'une certaine élasticité (1). Ce stroma est fait surtout de protéiques et de lipoïdes associés en un complexe et l'hémoglobine est aussi unie à ces corps, en combinaison physico-chimique. En dehors des actions osmotiques et des phénomènes d'hydratation des colloïdes, on peut supposer des actions nombreuses et diverses, capables de détruire le complexe et permettant à l'hémoglobine de diffuser : solvants des lipoïdes (éther, alcalis, sels biliaires), agents précipitants des protéiques, fusion des lipoïdes, adsorption des lipoïdes comme dans l'hémolyse obtenue par l'agitation des hématies avec des poudres inertes, etc. Il est bien probable que beaucoup d'agents hémolytiques, ceux-là mêmes dont l'action nous paraît la plus mystérieuse, sont capables de provoquer la diffusion de l'hémoglobine en associant plusieurs phénomènes de ce genre. Ainsi se comprend la diversité des causes capables de réaliser l'hémolyse et leur apparence parfois si compliquée.

Réaction de fixation Applications cliniques. — Si elles ne constituent qu'une explication toute provisoire, les théories de Bordet et d'Ehrlich ont eu l'avantage de présenter les faits d'observation sous une forme imagée et saisissante, et elles ont ainsi servi de guides aux recherches concernant les explications de l'hémolyse aux études d'immunité. D'après ces théories, l'hémolyse dépend de la fixation de trois éléments les uns sur les autres : quand ces trois substances (*antigène ou cellule, alexine ou agent hémolytique, corps intermédiaire*

(1) Il serait même possible d'envisager deux stromas, emboîtés l'un dans l'autre : un stroma histologique, feutré, plus dense à la périphérie, extrêmement lâche au centre, stroma cytoplasmique, reste du protoplasma de la cellule originelle, doué d'élasticité, expliquant les changements de forme de l'hématie dans les solutions isotoniques, sensible surtout aux influences osmotiques ; et un stroma physico-chimique, plus fragile, plus dissociable, résultat de la transformation chimique d'une partie des substances nucléaires et protoplasmiques de la cellule originelle, situé dans les mailles du premier et formé d'un complexe de protéiques, de lipoïdes et d'hémoglobine.

spécifique) se trouvent dans un milieu, elles ont une tendance à se fixer les unes sur les autres, le corps intermédiaire sur la cellule, puis l'alexine sur le corps intermédiaire.

Cette *réaction de fixation* (Bordet et Gengou) permet de reconnaître soit la présence de l'alexine (par addition d'antigène et de sensibilisatrice), soit la présence de sensibilisatrice spécifique (par addition de l'antigène ou de l'alexine), soit de l'antigène (par addition de sensibilisatrice et d'alexine).

On veut savoir, par exemple, s'il existe dans un liquide, de l'alexine libre. On choisit comme antigène des globules rouges de bœuf, comme sensibilisatrice du sérum de lapin préparé antibœuf qu'on a chauffé à 56° pour détruire son alexine propre. On met en présence le sérum chauffé et les globules. Ce sérum chauffé, ne contenant que la sensibilisatrice, ne peut hémolyser les globules rouges du bœuf ; c'est, comme on dit, un *système hémolytique inactif*. L'hémolyse ne peut se produire que par addition d'alexine. Si donc le sérum chauffé et les globules sont mis au contact du liquide où l'on recherche l'alexine, si l'hémolyse se produit, c'est que ce milieu contenait de l'alexine.

Un cas plus intéressant est celui de la recherche d'un anticorps (sensibilisatrice) spécifique. Il s'agit par exemple d'une maladie infectieuse due à un microbe déterminé dont on possède des cultures. On recherche la sensibilisatrice spécifique dans le sérum du malade. On met en présence : le sérum du malade chauffé à 56° pour détruire son alexine propre ; on ajoute le microbe (antigène), puis du sérum frais de cobaye neuf (alexine) ; on ajoute des globules de bœuf lavés à l'eau salée et du sérum de lapin-bœuf chauffé à 56° pour détruire son alexine propre. S'il y a hémolyse, c'est que le milieu contenait de l'alexine libre ; c'est que la combinaison ne s'est pas produite ; le sérum du malade ne contenait pas d'anticorps spécifique. L'hémolyse au contraire ne se produit pas, c'est que l'alexine s'est fixée : la combinaison s'est produite, le sérum du malade contient la sensibilisatrice spécifique. D'une manière analogue, on pourra rechercher la nature de l'antigène. La méthode se prête à une multitude de combinaisons.

Une des applications les plus célèbres de la réaction de fixation de Bordet est celle qui a été faite par *Wassermann* au diagnostic de la syphilis (1). Le principe de cette méthode se trouve dans la recherche de la sensibilisatrice spécifique que l'on suppose formée dans le sang des syphilitiques. La réaction consiste à mettre en présence d'un système hémolytique inactif (sérum de lapin-mouton inactif, c'est-à-dire chauffé à 56° pour détruire son alexine propre et globules de mouton) : 1° le sang à examiner ; 2° le sérum frais de cobaye normal, utilisé comme complément ; 3° de l'antigène. Théoriquement, cet antigène devrait être une culture de *Spirochetum pallidum*. On l'a remplacée d'abord par un extrait alcoolique de foie d'un enfant hérédo-syphilitique. Mais la réaction peut être faite aussi avec de l'extrait de foie normal et même avec des sels biliaires. La réaction de Wassermann ne serait donc pas causée par la présence d'antigènes syphilitiques dus au tréponème, mais seulement à des corps spécifiques du sérum de l'individu syphilitique déterminant la fixation du complément.

(1) L'exposé détaillé de la technique de la réaction de Wassermann et des modifications qui y ont été apportées (méthodes de Hecht et de Bauer) ne peut être fait ici. Le lecteur trouvera tous les renseignements nécessaires dans Macé, *Traité pratique de Bactériologie*, Paris, 1913 ; Ronchèse, *la Réaction de Bordet-Wassermann pour le séro-diagnostic de la syphilis*, Paris, 1919 ; Bordet, *Traité de l'immunité*, Paris, 1920 ; Noguchi *in* Gilbert et Weinberg, II, 1921.

Propriétés agglutinantes des sérums. Agglutination des hématies. — Lorsqu'on étudie l'action des sérums hémolytiques, on constate souvent que la phase de dissolution est précédée d'une phase d'agglutination des hématies. On avait d'abord considéré les deux phénomènes comme indépendants l'un de l'autre et produits sous l'influence de substances distinctes. Dans certains cas en effet, la propriété hémolysante disparaissait avec le chauffage, tandis que la propriété agglutinante persistait. L'étude méthodique des divers sérums hétérogènes tend à nous montrer au contraire dans l'agglutination des hématies un phénomène très voisin de l'hémolyse, une phase première du phénomène ou, si l'on veut, une hémolyse atténuée ; certains sérums, en effet, hémolysent les globules d'une espèce, agglutinent seulement ceux d'une autre, et si l'on met en série ces sérums suivant leur pouvoir hémolysant, la propriété agglutinante tient toujours la place d'une propriété hémolysante atténuée. Hémolyse et agglutination sont probablement sous la dépendance de réactions analogues (1). On a supposé, mais sans observation directe, que l'hémolyse consécutive à une agglutination massive par des précipités, était due à une déchirure des hématies ; mais c'est là une interprétation peu vraisemblable.

Le sérum humain normal agglutine énergiquement les globules lavés du lapin. Cette propriété est plus ou moins marquée suivant les individus. Lorsqu'on fait agir le sérum pur sur une émulsion globulaire, à parties égales, l'agglutination est presque instantanée et très forte ; elle aboutit à la formation d'une pellicule, qui se rassemble au fond du verre de montre dans lequel on fait la réaction. Si, au lieu d'employer du sérum pur, on fait agir sur les globules du sérum dilué dans de l'eau salée, l'agglutination diminue progressivement d'intensité ; l'agglutination cesse ordinairement de se produire lorsque le sérum est dilué à 1 p. 20. L'agglutination n'est plus caractérisée par la formation d'une pellicule, mais par la production de petits grains dus aux globules agglomérés en amas indépendants (2).

Certains sérums humains pathologiques peuvent agglutiner des globules d'homme normal. Cette propriété appartient à beaucoup de maladies. Elle est beaucoup plus fréquente que la propriété iso-hémolysante.

Quand un sérum essayé à l'état de pureté et dans la proportion de 2 à 3 de sérum pour 1 de globules ne produit dans un verre de montre aucune agglomération visible à l'œil nu après 20 minutes, le sérum est dit non agglutinant. Suivant que l'agglutination est faible ou forte, on peut encore obtenir la réaction en se servant de dilutions de sérum concentrées ou étendues. Si le pouvoir agglutinant est faible, le phénomène peut disparaître avec une dilution à 1 p. 5. S'il est très fort, l'agglutination peut encore être nette, quoique diminuée, avec une dilution à 1 p. 20 et plus.

Comme les agglutinines en général, cette agglutinine humaine vis-à-vis des globules humains résiste à la chaleur, et son activité subit seulement une diminution par le chauffage à 55° (3).

(1) Un certain nombre de corps inorganiques en solution colloïdale sont capables de produire l'hémolyse (hydrate ferrique colloïdal, acide silicique colloïdal, etc.). En général, le phénomène essentiel est ici l'agglutination des hématies qui n'est suivie d'hémolyse que lorsque les doses du colloïde ajouté sont très fortes. Le pouvoir agglutinant paraît être parallèle au pouvoir précipitant sur les albumines solubles. L'agglutination serait due à la précipitation de colloïdes à la surface des hématies.

(2) Pagniez, Th. Paris, 1902 ; — J. Camus et Pagniez, *Archives int. de Pharmacodynamie*, X, 1902.

(3) Il existe une analogie évidente entre le phénomène de l'agglutination des globules rouges et celui de l'agglutination des microbes. Pour l'étude de la *réaction de Widal* et

Isohémolysines et isoagglutinines. Application à la technique de la transfusion du sang. — La connaissance des propriétés hémolytiques des sérums normaux hétérogènes a été appliquée à la technique de la transfusion du sang. Elle a expliqué les accidents graves que l'on obtenait autrefois par l'injection de globules étrangers. Aujourd'hui, on sait que l'on ne peut injecter que des globules de même espèce. Mais il existe des isolysines et des isoagglutinines. Le sang du donneur doit donc être choisi avec soin. Il ne doit ni hémolyser ni agglutiner les globules du récepteur. On recueille chez les deux sujets 2 centimètres cubes de sang. On défibrine les échantillons par agitation avec des perles de verre ; on centrifuge, on décante le sérum.

Dans deux autres tubes à centrifuger, contenant une solution stérilisée de NaCl à 0,6 p. 100 contenant 1 p. 100 de citrate trisodique, on ajoute 1 centimètre cube des deux sang ; on centrifuge, et le culot globulaire est ensuite émusionné dans l'eau salée à 9 p. 1000. Dans des tubes de verre ou dans des pipettes scellées on mélange le sérum du donneur avec l'émulsion de globules du récepteur et le sérum du récepteur avec l'émulsion de globules du donneur. On porte à l'étuve à 37° et on examine au bout de 30 minutes. On ne doit pas voir d'agglutination (1).

On peut aussi essayer le sang d'un certain nombre de donneurs par la recherche extemporanée de l'agglutination par simple examen à l'œil nu (2).

Propriétés précipitantes des sérums. Détermination du sang humain. — Un certain nombre de substances albuminoïdes précipitables comme la caséine, peuvent servir d'antigène pour provoquer, dans le sérum de l'animal auquel on les injecte, l'apparition d'un pouvoir précipitant vis-à-vis de la substance injectée. Ces phénomènes consistent essentiellement dans une précipitation, dans une coagulation réciproque de colloïdes. *Gengou* (3) a montré que l'apparition de ces propriétés précipitantes se faisait exactement dans les mêmes conditions qui provoquent l'apparition des anticorps hémolytiques et que la fixation du complément se faisait par ces précipités exactement comme la fixation du complément qui se produit sur les globules aussitôt avant l'hémolyse. Les propriétés précipitantes apparues par inoculation sont jusqu'à un certain point spécifiques, exactement comme les propriétés hémolytiques. Elles ont été appliquées à la détermination de la nature du sang, et en particulier à la détermination du sang humain.

Si on injecte du sérum sanguin d'homme dans le péritoine d'un lapin, au bout de quelques jours, le sérum de lapin a acquis la propriété de précipiter *in vitro* le sérum de l'homme. Si on avait injecté un autre liquide albumineux que le sérum, par exemple, du liquide d'ascite, de pleurésie, du lait etc., le sérum de lapin préparé précipiterait ces liquides. Voici comment cette réaction est utilisée en médecine légale : On injecte à un lapin du sérum d'homme (4), à raison de 10 cen-

du séro-diagnostic de la fièvre typhoïde, consulter les traités de Bactériologie et aussi : Widal et Sicard, *Ann. Pasteur*, XI, 1897 et *in* Gilbert et Weinberg, II, 1921.

(1) Wallich et Levaditi, *Bull. Ac. de médecine*, 28 avril 1914 ; — Guillot, Dehelly et Morel, *la Transfusion du sang*, Paris, 1917.

(2) Méthode de Beth Vincent. Voir Jeanbrau et Giraud, *J. méd. français*, VIII, 1919, Pour la transfusion du sang, voyez ch. VIII *et* XVI.

(3) Gengou, *Annales Pasteur*, 1902 et *in* Gilbert et Weinberg, II, 1921.

(4) On peut employer, pour la préparation du lapin, du sang placentaire humain ou du liquide d'ascite.

timètres cubes dans la cavité péritonéale, tous les 4 à 5 jours, jusqu'à ce que 50 centimètres cubes aient été injectés. Le lapin étant ainsi préparé, on dissout la tache de sang dans l'eau salée (NaCl à 4 p. 1.000) de telle façon que la solution de sang soit environ à 1 p. 1.000. Le débris d'étoffe maculé est laissé en contact quelques heures afin que la dissolution des albumines soit complètement effectuée; puis on l'exprime et on aspire le liquide. Celui-ci est centrifugé et on ne s'en sert que lorsqu'il est devenu bien limpide. On le répartit dans de très petits tubes et on ajoute le sérum de lapin en gouttes de nombre croissant en faisant des tubes témoins. Il se produit un trouble et un précipité si le sang essayé était bien du sang d'homme. On fait l'épreuve de contrôle avec du sérum de lapin normal et dans ce cas, le liquide doit naturellement garder sa transparence. On fera également une épreuve de contrôle avec un fragment d'étoffe non souillé de sang. Le précipité produit par le sérum spécifique doit se dissiper par addition d'un peu d'ammoniaque. Les influences coagulantes auxquelles l'étoffe maculée de sang a pu être exposée (antiseptiques, ébullition, etc.), rendent les albumines insolubles et empêchent ainsi cette recherche.

A la réaction de précipitation, on peut ajouter, pour la détermination du sang humain, la réaction anaphylactique, qui semble avoir autant de valeur que la précédente. Elle est basée sur le principe suivant : un cobaye qui a reçu, en injection intraveineuse, une petite quantité de sang humain est, au bout de douze jours, sensibilisé pour le sang humain. Ce cobaye préparé présente des accidents anaphylactiques graves si on lui fait une injection de sang humain.

Propriétés diastasiques des sérums. Ferments de défense. — L'introduction dans l'organisme d'albumines étrangères est suivie d'une digestion intra-sanguine de ces substances étrangères sous l'action de diastases nouvelles apparues à la suite de l'injection. On peut se demander si des phénomènes du même ordre ne se passent pas lorsque sont introduits dans la circulation des substances protéiques appartenant au sujet, mais qui normalement n'existent pas dans le sang circulant. Ainsi, dans le placenta normal, l'épithélium des villosités choriales (1) forme des plasmodies qui deviennent libres dans les espaces sanguins maternels. Partant de ce fait d'observation connu, *Abderhalden* a cherché à voir si le sérum des femmes enceintes n'avait pas une action fermentative dégradante sur des fragments de placenta et il a obtenu des résultats positifs qui l'ont conduit à une méthode de séro-diagnostic de la grossesse. Ces faits et ces idées théoriques ont été appliquées à l'étude du diagnostic du cancer; mais la question est ici beaucoup plus compliquée et jusqu'ici il n'est pas prouvé que les réactions obtenues soient absolument spécifiques.

(1) Voir ch. XVIII.

CHAPITRE X

FORMATION DU SANG DE L'EMBRYON
APPARITION DES ÉBAUCHES SANGUINES

La formation du sang de l'embryon constitue le chapitre le plus important de l'hématopoièse. Les problèmes fondamentaux que soulève la genèse des éléments figurés du sang se posent déjà à cette période de la vie. Ils sont souvent moins compliqués que dans l'organisme adulte et par conséquent plus faciles à résoudre. Cette étude, faite d'une manière approfondie, facilitera les descriptions ultérieures.

Les premières cellules sanguines apparaissent à un stade très précoce du développement, sous forme de groupes cellulaires situés en dehors de l'embryon, à la périphérie du feuillet mésodermique extra-embryonnaire, à la surface des réserves vitellines. La formation de ces premières ébauches sanguines précède immédiatement l'apparition du réseau de l'aire vasculaire ; les cellules périphériques des ébauches participent à la formation des canaux sanguins de telle sorte qu'un peu plus tard, lorsque le cœur bat et lorsque le sang circule, les cellules des ébauches, dissociées, sont directement entraînées dans le liquide sanguin.

Ce mode de développement est général chez les Vertébrés, mais il est surtout facile à constater chez les Oiseaux, les Reptiles et les Mammifères. Aussi les étudierons-nous d'abord.

Chez les Oiseaux et les Reptiles, les œufs sont volumineux et riches en vitellus. Les premiers vaisseaux et les premières ébauches sanguines se forment en dehors de l'embryon, à la surface du vitellus, et le réseau vasculaire de la vésicule ombilicale joue pendant le développement un rôle considérable, non seulement dans l'absorption du vitellus, mais aussi dans la fabrication des cellules sanguines. Chez les

Mammifères, l'œuf est beaucoup plus petit ; il est presque privé de réserves nutritives. Bien que la vésicule ombilicale ait un rôle extrêmement réduit et qu'elle s'atrophie de bonne heure, c'est encore à sa surface qu'apparaissent les premières ébauches sanguines. On ne peut guère expliquer cette disposition curieuse, qu'en supposant que les Mammifères descendent d'animaux à œufs volumineux, riches en vitellus, se développant sans placenta intermédiaire. Dans ces conditions, on comprend que les ébauches vasculaires et sanguines aient apparu à la surface de la vésicule ombilicale. Lorsque, plus tard, une nouvelle circulation s'est développée, permettant des échanges actifs entre le sang maternel et le sang fœtal, les réserves de l'œuf sont devenues inutiles. La vésicule ombilicale a perdu de son importance, mais les premiers vaisseaux ont continué à se former à sa surface. On sait du reste que chez les mammifères les plus inférieurs, Monotrèmes et Marsupiaux, les embryons se développent sans placenta ; ils naissent de bonne heure et achèvent leur développement dans la bourse marsupiale. Ici les vaisseaux vitellins, au contact de la muqueuse utérine, jouent certainement un rôle d'échange. Ils en jouent un également chez les mammifères placentaires avant la formation du placenta, avant l'apparition de la circulation allantoïdienne : les vaisseaux vitellins, qui chez les Sauropsidés puisaient leurs matériaux nutritifs dans le vitellus, les puisent, chez les Mammifères, en dehors, dans les vaisseaux de l'organisme maternel. Le contact est souvent rendu plus intime grâce à l'existence d'une caduque. Chez beaucoup de mammifères, la circulation vitelline disparaît de bonne heure, avec la vésicule ombilicale qui s'atrophie ; il en est ainsi chez l'homme. Chez d'autres, comme le lapin, malgré la disparition de la cavité de la vésicule, la circulation vitelline reste très développée jusque dans les derniers temps de la vie intra-utérine et concourt, avec le placenta, à la respiration et à la nutrition de l'embryon, en même temps qu'elle conserve un rôle important dans la fabrication des hématies.

ÉBAUCHES SANGUINES DES MAMMIFÈRES

L'apparition des premières ébauches sanguines est extrêmement précoce : on l'observe à un stade où le disque germinatif ne montre encore qu'une ligne primitive et un court prolongement céphalique. Le lapin et le cobaye sont des objets très favorables.

ÉBAUCHES SANGUINES DU LAPIN

Le lapin est un objet précieux pour l'étude embryonnaire du sang à cause de la facilité avec laquelle on peut recueillir des stades précis du développement.

La durée de la gestation est de 30 jours; la formation des ébauches sanguines se fait au huitième jour. Les jeunes femelles, isolées, entrent en rut à la fin de l'hiver, vers le milieu de février. On les présente au mâle et on note le jour et l'heure de l'accouplement. On est alors certain de pouvoir recueillir des embryons d'un âge déterminé. Chez le lapin, l'ovulation n'est pas spontanée (1) : les follicules de Graaf se rompent environ dix heures après l'accouplement ; tous les ovules mûrs se rompent à peu près en même temps. Vers la dixième heure après l'accouplement, les œufs sont arrivés dans la trompe ; la fécondation se produit et la segmentation commence. Celle-ci donne lieu à la formation d'une petite masse cellulaire pleine, dans laquelle apparaît ensuite au quatrième jour, une cavité de segmentation. A ce moment, l'œuf est arrivé dans l'utérus. Au 5e jour, apparaît à l'un des pôles de cette vésicule un épaississement qui constitue la tache embryonnaire. Celle-ci d'abord arrondie, s'allonge légèrement et devient piriforme. A ce moment, au 7e jour, l'œuf a l'aspect d'une petite vésicule transparente, cristalline, de 3 à 4 millimètres de diamètre ; il est entouré d'une couche d'albumine et exactement accolé à la muqueuse utérine à laquelle il n'adhère pas encore ; le pôle embryonnaire se trouve placé du côté mésométrique, c'est-à-dire qu'il regarde le côté de l'utérus où arrivent les vaisseaux ; c'est là que se formera plus tard le placenta. La tache embryonnaire, piriforme, présente dans la deuxième moitié du 7e jour, vers son extrémité effilée (postérieure ou caudale) une courte ligne primitive. Sur les coupes transversales de l'œuf perpendiculaires à l'axe de la ligne primitive, on voit celle-ci constituée d'abord par un épaississement de l'ectoderme auquel est accolé un mince feuillet endodermique. A ce moment, la vésicule germinative est formée seulement par deux feuillets ; le mésoderme n'est pas encore apparu.

Ce sont les œufs du 8e jour qui doivent être recueillis pour l'étude des premières ébauches sanguines. Celles-ci n'apparaissent qu'à la fin du 8e jour, 188 heures environ après l'accouplement ; mais les œufs de la première moitié du 8e jour et même de la fin du 7e jour fourniront des renseignements très instructifs, parce que c'est à ce stade que se développe le feuillet mésodermique.

Au 8e jour, l'œuf n'est pas encore fixé à l'utérus, bien qu'il ait acquis sa place définitive. Les renflements utérins ont environ 8 à 9 millimètres de diamètre. L'un d'eux est maintenu avec deux épingles, sur le fond d'un petit cristallisoir, de telle manière que la saillie du renflement opposée au mésométrium (2), soit

(1) Barry, *Philosoph. Trans.*, 1840 ; — Coste, *Histoire générale et particulière du dev. des corps organisés*, Paris, 1847-1859 ; — Bischoff, *Traité du développement de l'homme et des mammifères suivi d'une histoire de développement de l'œuf du lapin*, Paris, 1843 ; — Regaud et Dubreuil, *S. de Biologie*, 28 mars 1908. Voir aussi sur l'œuf du lapin : Van Beneden, *Archives de Biologie*, I, 1880 et XXVII, 1912 ; — Kölliker, *Festschrift J. Maximilians Universität zu Wurzburg*, Leipsig, 1882 ; — Van Beneden et Julin, *Archives de Biologie*. V. 1884 ; — Mathias Duval, *J. de l'Anatomie*, XXV, 1889 et XXVI, 1890 ; — Tourneux, *Précis d'embryologie*, 1921.

(2) Ce qu'on appelle souvent le côté antimésométrique.

tournée du côté de l'observateur (1). Tenant entre les mors d'une fine pince les parties superficielles du renflement, on enfonce franchement la pointe de fins ciseaux dans la cavité de l'œuf. On fend la paroi suivant l'axe de l'utérus ; il s'écoule un liquide clair comme de l'eau : c'est le liquide vitellin contenu dans la cavité de l'œuf. Les lèvres de l'incision, qui doivent comprendre, à la fois, la paroi de l'œuf et la paroi de l'utérus, sont soulevées doucement avec une pince et fendues transversalement, de sorte que le renflement utérin se trouve ouvert par une petite incision cruciale. L'embryon se trouve toujours sur le côté mésométrique ; du moment que la pointe des ciseaux reste libre dans la cavité de l'œuf, on est sûr de ne pas le léser.

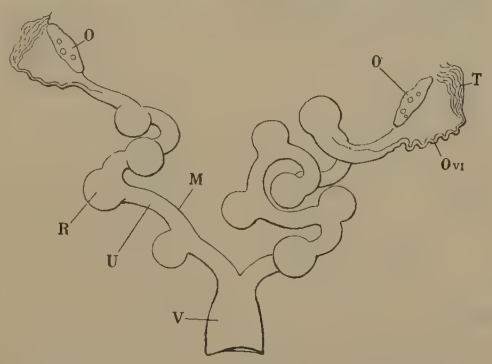


Fig. 273. — Tractus génital de lapine contenant 10 embryons du 9e jour.

U, corne utérine ; — *R*, renflement ovulaire ; — *M*, bord de la corne utérine auquel s'insère le mésométrium ; — *V*, vagin ; — *O*, ovaire ; — *Ovi*, oviducte ; — *T*, pavillon de la trompe. — Réduit de moitié.

A ce stade, même en regardant à la loupe, il est bien difficile d'apercevoir l'embryon. Il n'est pas nécessaire de s'en préoccuper. On verse le fixateur directement, goutte à goutte. Les mélanges bichromate-sublimé-formol sont les plus recommandables ; ils produisent un coagulum, mais moins abondant que celui que donnent les fixateurs usuels acétifiés. On continue à verser le fixateur, goutte à goutte, jusqu'à ce que le coagulum ait disparu. On décante alors le contenu du cristallisoir et on le remplit avec du liquide fixateur neuf jusqu'à ce que l'œuf soit complètement baigné.

Au bout d'une heure et demie environ, l'action du bichromate-sublimé-formol a été suffisante. On porte le renflement dans une quantité convenable d'eau distillée, qu'on renouvelle plusieurs fois. Après 24 heures, et lorsqu'on juge que le lavage a été suffisant, le renflement est porté dans des alcools de concentration croissante et dans l'alcool à 70° iodé dans lequel il séjourne 24 heures, puis dans l'alcool iodé à 70° pour enlever l'iode. Épinglant de nouveau le renflement sur le fond du cristallisoir rempli, cette fois, d'eau distillée, on détache la paroi de l'œuf. Celle-ci est excessivement mince et fragile. L'opération est faite sous la loupe ou sous le microscope binoculaire, avec l'aide d'une aiguille courbe, à pointe émoussée, bien polie, dont on fait agir tantôt la pointe, tantôt la partie courbe et convexe. On commence le plus loin possible de l'embryon et on soulève progressivement la mince membrane ovulaire. Lorsqu'elle flotte, on la recueille avec une

(1) L'ouverture de l'œuf peut être faite aussi dans l'eau salée à 8 p. 1.000, chauffée à 37°. On fait agir ensuite le fixateur. L'opération est rendue ainsi plus facile ; mais la fixation est plus sûre lorsque le fixateur agit directement. On se servira, pour ouvrir l'œuf, d'un petit cristallisoir dans le fond duquel on aura coulé de la paraffine noircie en y incorporant du noir de fumée. La fixation des œufs du 8e jour est délicate ; les chercheurs qui voudront répéter ces observations feront bien de commencer par ouvrir des œufs du 9e jour, plus gros, et dont l'aire vasculaire est plus facile à recueillir, bien qu'elle adhère déjà en partie à l'utérus.

spatule et on la porte dans l'eau distillée ; on l'examine, sur fond noir, au microscope binoculaire. Pour qu'elle s'étale bien, on y pratique tout autour, avec des ciseaux, quelques sections rayonnées. Le disque ou écusson embryonnaire, déjà bien formé, fait absolument corps avec la membrane de l'œuf ; son relief existe à peine ; l'embryon ne se distingue que parce que certaines parties sont plus opaques, et que d'autres sont plus transparentes ; ces images rappellent celles que donnent les papiers gaufrés. Sur fond noir, l'embryon apparaît plus blanc que le reste de la membrane ; par transparence, il apparaît naturellement plus foncé. De la même manière, les ébauches sanguines, lorsqu'elles sont apparues tout autour de l'embryon, se montrent sous forme de petits îlots blancs sur fond noir et gris opaque, lorsque la membrane est examinée par transparence.

Fig. 274. — Aire embryonnaire de lapin au cours du 7e jour, avant l'apparition des ébauches sanguines et au moment de la formation du mésoderme. D'après Van Beneden. On voit le disque embryonnaire piriforme parcouru dans sa moitié caudale par la ligne primitive avec le sillon primitif. Chacune des deux extrémités de la ligne primitive est terminée par un renflement. L'un est le nœud de Hensen ou nœud antérieur (en haut dans la figure); l'autre est le nœud postérieur ; ce dernier occupe le centre d'une aire circulaire plus opaque, l'aire mésodermique.

Lorsqu'on a ainsi observé les disques germinatifs recueillis et fixés, on les colore et on les monte à plat en préparation persistante. D'autres disques germinatifs du même stade seront mis de côté ; ils seront ensuite inclus et on y pratiquera des coupes (1).

Bien qu'elles ne donnent pas des préparations aussi transparentes que le carmin, les méthodes de coloration qui conviennent le mieux ici pour colorer les disques germinatifs que l'on veut monter entiers et à plat, sont les doubles colorations à l'éosine-orange-toluidine et à l'hématéine-éosine. Avec une spatule, le disque germinatif est porté successivement dans les bains colorants, dans les eaux de lavage, les alcools progressifs et le xylol, reçu sur la lame et monté dans le baume ou dans la résine dammare. Si l'on a eu soin, avant la coloration, de donner quelques coups de ciseaux au pourtour, la membrane s'étalera convenablement.

Les préparations ainsi faites et qui se rapportent à des disques germinatifs de la fin du 7e jour et de la première moitié du 8e jour, montrent les faits suivants : Le disque embryonnaire est piriforme. Sa grosse extrémité est l'extrémité antérieure ou céphalique ; l'extrémité pointue est l'extrémité postérieure ou caudale ; on y aperçoit une ligne axiale plus colorée, parcourue souvent par une mince traînée claire : le *sillon primitif*. Sur les disques germinatifs les plus développés, la *ligne primitive* se prolonge, vers l'extrémité céphalique par une ligne foncée, le *pro-*

(1) On trouve en général 4 ou 5 œufs dans chaque corne utérine. Ces œufs sont à peu près au même stade, mais peuvent présenter de petites différences. Les disques germinatifs mis de côté pour obtenir des coupes seront, avant l'inclusion, repérés et dessinés.

longement céphalique, ébauche de la corde dorsale. L'extrémité céphalique de la ligne primitive montre le *nœud de Hensen*, son extrémité caudale forme le *nœud postérieur*. En dehors du disque embryonnaire, la membrane présente une transparence différente suivant qu'on l'observe près du disque embryonnaire ou beaucoup plus en dehors. Tout autour du disque embryonnaire, en effet, la membrane est plus foncée et comme plus épaisse ; cette portion plus opaque est beaucoup plus développée de chaque côté et en arrière de l'embryon qu'en avant ; elle correspond à la présence du mésoderme qui, parti de chaque côté de la ligne primitive, s'insinue entre les deux feuillets primitifs et s'avance, de plus en plus, vers la périphérie. Sur les disques germinatifs examinés de face, l'*aire mésodermique* apparaît d'abord comme une aire circulaire dont le nœud postérieur de la ligne primitive occupe à peu près le centre et qui s'agrandit ensuite, excentriquement. Observée à un grossissement suffisant, la préparation montre en ce point, les cellules mésodermiques, étoilées, anastomosées en une lâche dentelle ; elles présentent de nombreuses mitoses. Lorsque la cellule mésodermique se divise, elle quitte ses connexions et devient globuleuse. Mais il n'existe pas encore, à ce stade, d'ébauches sanguines.

C'est seulement sur des disques germinatifs de la fin du 8e jour (1), environ cent quatre-vingt-huit heures après l'accouplement, qu'on commencera à apercevoir nettement les premières *ébauches sanguines* (2). A ce stade, représenté dans la figure 275, la gouttière primitive n'occupe plus que le tiers postérieur du disque embryonnaire ; en avant d'elle, on aperçoit la gouttière médullaire ; à la limite des deux, on observe l'orifice du canal neurentérique. L'extrémité céphalique du disque s'est développée ; enfin, de chaque côté de la gouttière médullaire, on aperçoit souvent une zone transversale plus sombre ; c'est là qu'apparaîtront les premières protovertèbres.

L'embryon est entouré d'une aire transparente étroite, en dehors de laquelle on voit une large zone opaque qui correspond à l'aire mésodermique et qui va devenir l'aire vasculaire. L'opacité de cette zone est due, non seulement à la présence du mésoderme, mais encore, et surtout à l'épaisseur plus grande de l'ectoderme, comme on le constate facilement sur les coupes. Au milieu de l'aire vasculaire, cet ectoderme commence à présenter des parties saillantes, des inégalités suivant une zone en fer à cheval ouverte en avant. Cette zone inégale, bien visible chez les embryons possédant déjà deux ou trois paires de somites, est la zone placentaire, au niveau de laquelle l'œuf, un peu plus tard, se fixera à l'utérus.

(1) Van der Stricht, *S. de Biologie*, 16 mars 1895.

(2) Ou *îlots sanguins*. Les deux termes sont pris aujourd'hui à peu près comme synonymes. Cependant le terme d'îlot sanguin, employé par les anciens auteurs, correspond plutôt aux groupes de cellules sanguines provenant de la dissociation des ébauches et contenus déjà dans une cavité vasculaire. Nous emploierons donc surtout le terme *d'ébauche* pour désigner les germes primitifs non dissociés.

A la périphérie de l'aire mésodermique, en arrière et de chaque côté, on aperçoit de petites taches sombres qui correspondent aux premières ébauches sanguines. Elles forment une ligne pointillée qui trace la direction du futur sinus marginal. Elles sont constituées par des groupes cellulaires dans lesquels les cellules mésodermiques se sont libérées de leurs connexions, et ont pris une forme arrondie. Leur noyau est arrondi et volumineux, la chromatine y est disposée

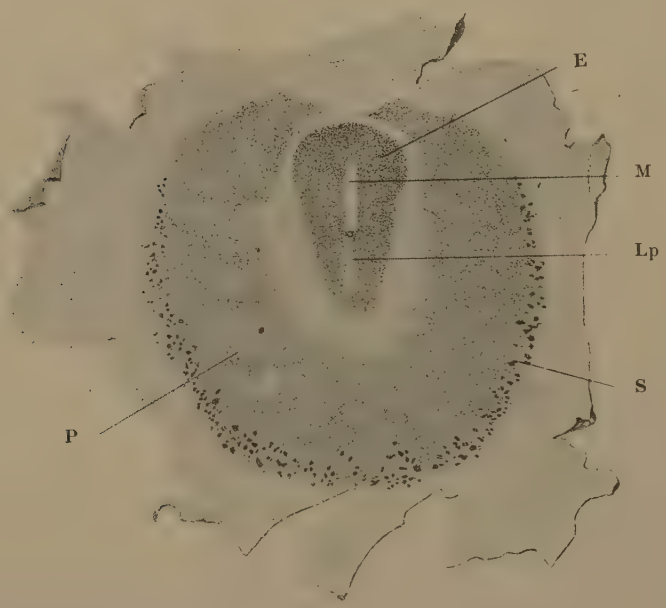


Fig. 275. — Œuf de lapin du 8e jour (7 jours, 20 heures). Disque germinatif. *E*, Embryon, extrémité céphalique ; — *M*, gouttière médullaire; — *Lp*, ligne primitive. Entre les deux, on voit l'orifice du canal neurentérique ; — *P*, fer à cheval ectoplacentaire, formé par un épaississement de l'ectoderme ; — *S*, ébauches sanguines.

en gros amas peu nombreux ; le cytoplasme est opaque, homogène ; il prend les couleurs nucléaires ; il ne contient pas encore d'hémoglobine. Ces cellules sont les *cellules sanguines primitives.*

A ce moment, il n'existe encore aucun vaisseau ; mais on ne tarde pas à les observer. A la périphérie des groupes cellulaires qui constituent les ébauches sanguines en îlots sanguins, on voit bientôt apparaître des cellules mésodermiques fusiformes, allongées, qui les enveloppent plus ou moins complètement. En même temps, dans la zone la plus interne de l'aire vasculaire, on voit des capillaires limités par des cellules endothéliales et qui ne contiennent aucune cellule sanguine. Les capillaires de l'aire vasculaire se forment donc par un

double mécanisme ; à la périphérie, leur formation est due à une différenciation particulière des ébauches et ils sont, dès leur apparition, remplis par les cellules sanguines primitives ; dans la partie interne de l'aire vasculaire, leur genèse est tout à fait distincte de celle des ébauches sanguines et ils sont primitivement vides. Ces phénomènes se poursuivent dans les stades suivants, pendant l'apparition des premières protovertèbres que l'on observe, en général, dans les dernières heures du 8e jour.

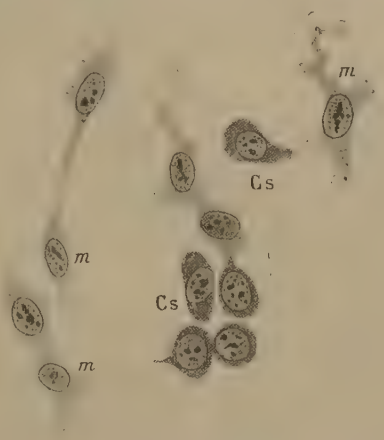


Fig. 276. — Œuf de lapin du 8e jour. Une des ébauches sanguines de la figure 275 représentée à un plus fort grossissement. Différenciation des cellules sanguines primitives (*Cs*) aux dépens des cellules mésodermiques (*M*). 750 diam.

Rapport des ébauches sanguines avec les feuillets germinatifs. Formation des premiers vaisseaux. — Les faits que nous venons d'observer sur des disques germinatifs du 8e jour montés à plat en préparation persistante doivent être contrôlés sur des coupes.

Celles-ci seront pratiquées en série, transversalement à l'axe de l'embryon, sur des disques germinatifs inclus en entier dans la paraffine. Pour empêcher la rétraction pendant les manipulations, on multiplie les alcools intermédiaires, les mélanges xylol-alcool absolu et on se sert toujours d'une petite spatule métallique pour transporter l'objet. Pendant la confection du bloc, on prend des points de repère précis de façon à pouvoir reconnaître l'axe de l'embryon et à pratiquer des coupes bien orientées. Ces coupes seront colorées par l'éosine-orange-toluidine et par l'hématéine-éosine.

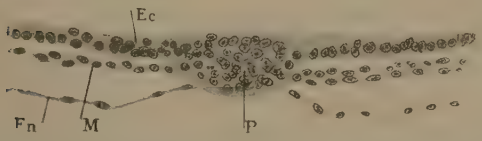


Fig. 277. — Embryon de lapin du 8e jour (âgé de 7 jours, 20 heures). Coupe transversale du disque germinatif à l'extrémité céphalique de la ligne primitive, au niveau du nœud de Hensen, pour montrer les rapports du mésoderme.

P, massif de la ligne primitive ou se trouvent confondus les trois feuillets; — *Ec*, ectoderme ; — *En*, endoderme ; — *M*, mésoderme. 220 diam.

Sur les coupes transversales passant par la ligne primitive, et concernant des embryons ne possédant pas encore de somites, comme celui qui est représenté figure 275, on voit le disque germinatif constitué par ses trois feuillets.

Sur les coupes intéressant la partie antérieure, céphalique de la ligne primitive, les trois feuillets apparaissent confondus. De chaque côté de ce massif cellulaire, part le feuillet mésodermique qui, comme deux ailerons, s'insinue entre l'ectoderme et l'endoderme (1). Sur les coupes passant plus en arrière, l'endoderme est libre, le mésoderme se détache de l'ectoderme épaissi.

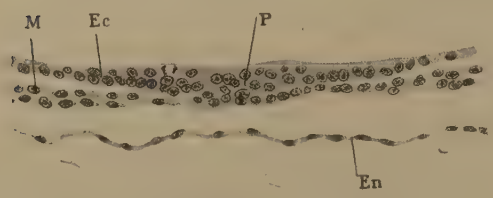


Fig. 278. — Même embryon que figure 277. Coupe transversale de la ligne primitive un peu plus vers l'extrémité caudale. A ce niveau, le mésoderme (*M*) est uni à l'ectoderme (*Ec*) au niveau de la ligne primitive (*P*). L'endoderme (*En*) est libre. 220 diam.

Sur ces coupes, à la périphérie, on aperçoit les petits groupes cellulaires qui constituent les ébauches sanguines. Ils ne sont primitivement entourés par aucune cellule endothéliale. Les cellules, arrondies, à gros noyau nucléolé, à cytoplasme sombre, coloré par les couleurs nucléaires, sont libres. Elles se différencient aux dépens du feuillet mésodermique, très mince, dont les cellules apparaissent fusiformes sur les coupes. Les ébauches sanguines sont séparées de l'ectoderme par des cellules mésodermiques; elles sont, au contraire, directement au contact de l'endoderme auquel elles peuvent être, parfois, étroitement accolées. Ces rapports ont

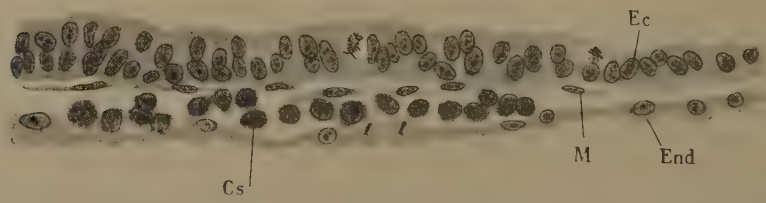


Fig. 279. — Embryon de lapin du 8e jour, ne possédant pas encore de somites (stade fig. 275). Coupe transversale du disque germinatif au niveau de l'extrémité postérieure de la ligne primitive. Portion distale de la coupe pour montrer la situation des ébauches sanguines.

Ec, ectoderme; — *End*, endoderme; — *M*, mésoderme; — *Cs*, cellules sanguines primitives 320 diam.

été interprétés par quelques auteurs en faveur de l'origine endodermique des ébauches sanguines; mais, il s'agit là de relations secondaires, de simple contact. La différenciation des cellules sanguines aux dépens des cellules mésodermiques est facile à observer. Il n'en

(1) Cette fusion des trois feuillets à l'extrémité antérieure de la ligne primitive correspond à ce qu'on nomme le *nœud de Hensen*.

reste pas moins qu'au fur et à mesure qu'elles se forment, les cellules sanguines s'accumulent à la surface du feuillet nourricier, de l'endoderme, qu'elles dépriment même, en certains points, y formant de petites gouttières. Quant au feuillet mésodermique lui-même, aux dépens duquel se forme l'aire vasculaire, il constitue ce qu'on appelle le mésoblaste périphérique ou extra-embryonnaire et il doit être considéré ici comme la portion périphérique du mésoblaste axial qui, parti de chaque côté du massif de la ligne primitive, s'est avancé progressivement de dedans en dehors entre les deux feuillets primordiaux (1).

Pour observer les premiers phénomènes de différenciation qui

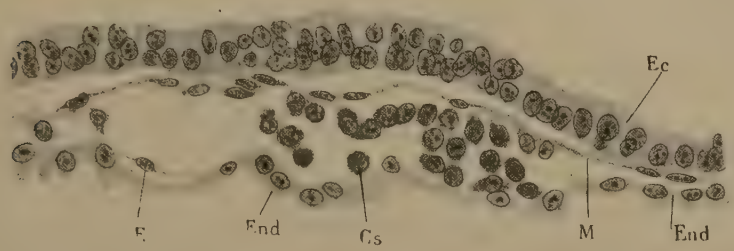


Fig. 280. — Embryon de lapin du 8e jour, un peu plus âgé, possédant deux paires de somites. Coupe transversale du disque germinatif juste en arrière de la ligne primitive. Portion distale de la coupe, au niveau des ébauches sanguines.

Ec, ectoderme; — *End*, endoderme ; — *M*, mésoderme; — *Cs*, cellules sanguines primitives; — *E*, cellule mésodermique qui va former une cellule endothéliale vasculaire. 320 diam.

se produisent au niveau des îlots sanguins, ainsi que la formation des premiers vaisseaux, il faut examiner des coupes d'embryons un peu plus âgés, possédant déjà deux ou trois paires de somites en formation. Du reste, la différenciation des îlots étant, en général, plus avancée dans les parties postérieures du disque, les différents stades peuvent être observés sur le même disque germinatif, sur des coupes différentes.

La multiplication des cellules sanguines primitives, par mitose, se poursuivant avec activité, les groupes cellulaires que l'on observe à la surface de l'endoderme sont de plus en plus importants. On les

(1) Quelques auteurs (Bonnet, Hubrecht, Mathias Duval, etc.) sur différents objets, ont admis une participation de l'endoderme à la formation du mésoblaste périphérique. Mais cette manière de voir est peu probable. D'après Bonnet, chez le mouton, l'apparition du sang serait très tardive et se ferait dans l'embryon même et non à la surface de la vésicule ombilicale. Mais ces faits auraient besoin d'être confirmés par des recherches sur le même objet. Sur l'origine même du feuillet moyen, voyez surtout : Van Beneden, *Archives de Biologie*, XXVII, 1912 ; Hertwig, *Handbuch der vergl. und exp. Entwickelungslehre*, 1906, I, et Brachet, *Traité d'Embryologie des Vertébrés*, Paris, 1921.

voit progressivement entourés par des cellules mésodermiques fusiformes qui constituent une paroi endothéliale. Ce phénomène n'est pas toujours, en réalité, une différenciation secondaire des îlots ; le plus souvent, les groupes cellulaires sont enveloppés par les cellules mésodermiques voisines, qui, progressivement, s'insinuent entre eux et l'endoderme, se glissent à la surface de ce dernier, tapissant les gouttières, et, finalement, constituent aux îlots sanguins une véritable paroi endothéliale. On comprend que, de cette façon, un certain nombre de cellules sanguines primitives puissent, çà et là, se trouver en dehors des cavités vasculaires. Dans les parties de l'aire vasculaire plus rapprochées de l'embryon, là où il n'existe pas d'ébauches sanguines, les cellules mésodermiques, soit en se groupant, soit en s'enroulant sur elles-mêmes, soit même en se vacuolisant, forment des tubes endothéliaux qui, primitivement, ne contiennent aucune cellule sanguine et dans lesquels les globules sanguins n'arriveront qu'un peu plus tard, lorsque la communication de tous ces germes vasculaires sera réalisée.

Différenciation des ébauches. Cellules sanguines primitives et hématies primordiales. — La différenciation des ébauches sanguines doit être étudiée sur des embryons du 9e jour.

L'aire vasculaire sera recueillie comme nous l'avons indiqué plus haut. L'œuf étant plus gros, l'opération sera plus facile qu'au 8e jour. Toutefois, au début du 9e jour, l'œuf se fixe à l'utérus au niveau de la zone placentaire en fer à cheval (1). L'ectoderme chorial, proliféré, s'insinue dans les dépressions de la muqueuse utérine et y adhère. Si, à ce stade, on cherche à isoler l'œuf, on arrache forcément des lambeaux d'ectoderme qui restent adhérents à la muqueuse utérine. Pour détacher le disque germinatif, on ouvre l'œuf comme précédemment, on le fixe et on le place ensuite dans l'eau. Sous la loupe, on soulève le bord du disque germinatif avec la pointe mousse d'une aiguille courbe ; on arrive facilement à le libérer sur tout le pourtour ; arrivé aux parties centrales, adhérentes, on se sert du dos convexe de l'aiguille, et on détache doucement la membrane, par petits coups, en appuyant l'aiguille sur la surface utérine.

Ces disques germinatifs seront colorés et montés comme nous l'avons indiqué plus haut. Pour que le disque s'étale bien, on y pratique, avec des ciseaux, des sections radiées.

Au début du 9e jour, l'embryon est déjà bien différencié ; il possède 5 ou 6 paires de somites ; les deux ébauches cardiaques sont encore séparées, elles se voient de chaque côté de l'extrémité antérieure de l'embryon. A ce moment, les îlots sanguins forment un cercle complet autour de l'embryon (fig. 281). Pendant le 9e jour, les vaisseaux continuent à se former avec activité ; ils envahissent toute

(1) Fer à cheval placentaire de Van Beneden, croissants placentaires de Mathias Duval.

l'aire vasculaire et communiquent entre eux. Les ébauches cardiaques se rapprochent et se réunissent sur la ligne médiane au devant de l'embryon. A la fin du 9e jour, le cœur bat et le sang circule ; le sinus marginal est formé. Les battements du cœur peuvent être observés à la loupe en ouvrant l'œuf dans l'eau salée à 8 p. 1000, chauffée à 37°, On aperçoit alors, parfois, dans le cœur, une très légère coloration rosée, indice de l'apparition de l'hémoglobine. Le sinus marginal est visible à l'état vivant, mais son contenu apparaît, en général, incolore. De

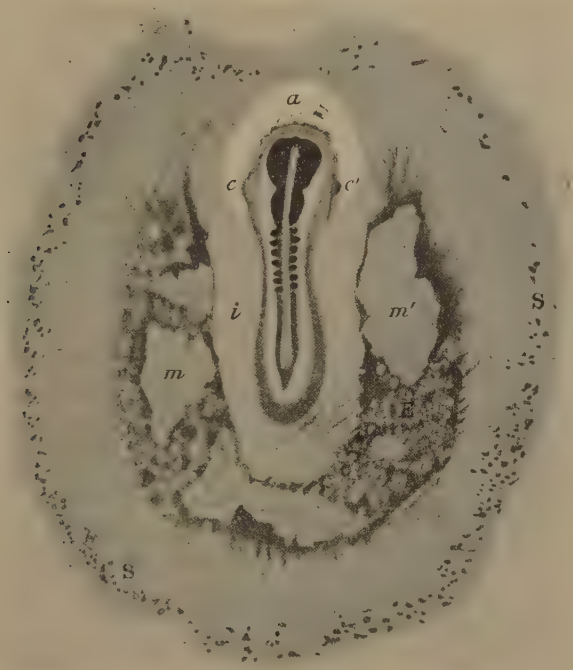


Fig. 281. — Embryon de lapin du début du 9e jour.

a, champ amniotique; — *c*, *c'*, ébauches cardiaques; — *i*, portion interne de l'aire vasculaire où ne se forment que des ébauches vasculaires primitivement vides de sang ; — *S*, *S*, cercle des ébauches sanguines, traçant la place du futur sinus marginal; — *E*, ectoplacenta ; — *m*, *m'*, points où l'ectoplacenta est resté adhérent à l'utérus, laissant à nu la couche mésodermique. 10 diam.

l'aire vasculaire, on ne voit à peu près rien dans ces conditions ; elle est mince, transparente, et ne laisse apercevoir, à l'état vivant, que la surface mamelonnée des cotylédons utérins qu'elle recouvre exactement.

Sur les disques germinatifs fixés, colorés et montés en préparations persistantes, on constate que la zone placentaire, au début du 9e jour, est peu considérable ; à la fin du 9e jour, au contraire, elle est extrêmement étendue ; sur toute la portion centrale de l'aire vasculaire, l'ectoderme a disparu ; il est resté adhérent à l'utérus.

C'est pendant le 9e jour que s'accomplissent les phénomènes les

plus importants de la différenciation des premières cellules sanguines. On peut les suivre facilement sur les disques germinatifs colorés et montés à plat.

Les cellules mises en liberté dans le plasma sanguin par la dissociation des îlots sont d'abord absolument dépourvues d'hémoglobine. Ce sont les *cellules sanguines primitives*. Elles sont volumineuses, arrondies ; leur noyau, arrondi également, occupe une grande partie de la cellule ; la chromatine y est rassemblée en un, deux ou trois grains volumineux. Le protoplasma est homogène et prend énergiquement les couleurs basiques. A côté du noyau, on voit parfois une tache claire, représentant la sphère attractive. Le contour de la cellule montre exceptionnellement des déformations, des bosselures.

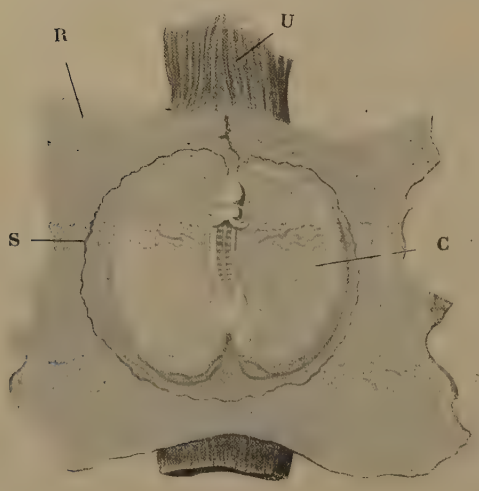


Fig. 282. — Embryon de lapin de la fin du 9e jour. Renflement utérin ouvert pour montrer le disque germinatif en place.

U, corne utérine ; — *R*, lambeau du renflement utérin auquel est accolée la paroi de l'œuf ; — *C*, cotylédons utérins dont on aperçoit la surface inégale à travers la transparence de la paroi ovulaire ; — *S*, sinus marginal dans lequel commence à circuler un sang déjà un peu coloré par l'hémoglobine. 3 diam.

Ces cellules sanguines primitives représentent des cellules mésoblastiques différenciées ; elles ont la même origine que les cellules endothéliales qui les entourent. Aussi n'est-il pas étonnant de voir, par places, des cellules endothéliales se gonfler et se transformer directement en cellules sanguines libres. Ce mode de formation n'est pas rare, dans l'aire vasculaire du lapin, à la fin du 9e jour et même pendant le 10e jour (1).

Les cellules sanguines primitives se multiplient activement par mitose. Dans la dernière partie du 9e jour, un grand nombre subissent une transformation. Le noyau devient plus petit, plus régulièrement arrondi ; la chromatine se dissémine et forme un réseau. Le protoplasma,

(1) Ce mode de formation serait la règle, chez le mouton, d'après Bonnet : les cellules sanguines proviendraient ici, non d'ébauches pleines, mais de la transformation des cellules endothéliales de capillaires primitivement vides de sang ; ces observations ont besoin d'être confirmées sur le même objet.

homogène, devient plus réfringent; une légère teinte jaune y apparaît progressivement à l'état frais. Après l'action des bons fixateurs de l'hémoglobine, il prend, avec les colorations combinées éosine-bleu, une teinte intermédiaire violette ou rose, d'autant plus rosée que l'hémoglobine est plus abondante. Finalement, le protoplasma devient

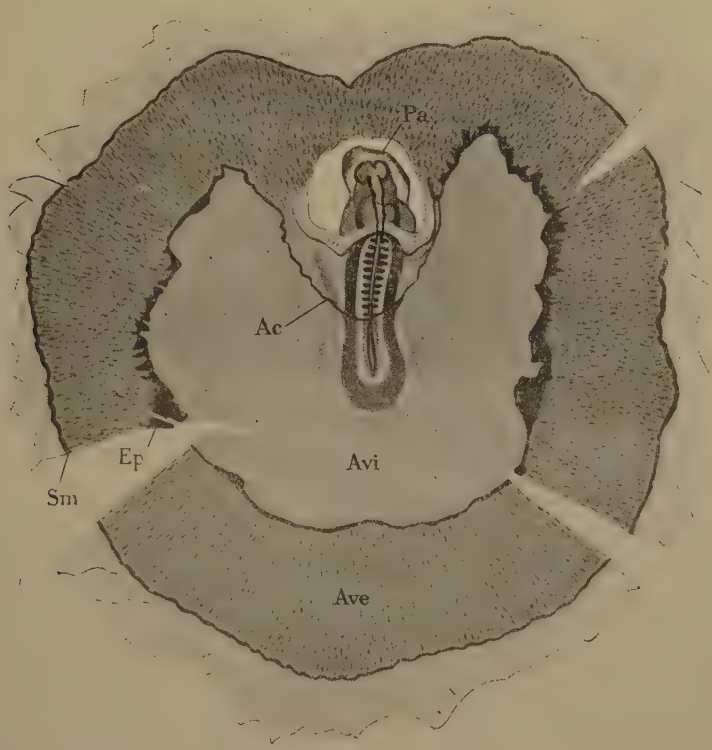


Fig. 283. — Embryon de lapin de la fin du 9e jour. Le disque germinatif a été incisé à la périphérie pour pouvoir être étalé; il montre sa face externe, ectodermique.

Ave, portion externe de l'aire vasculaire limitée en dehors par le sinus marginal *Sm*, et en dedans par l'ectoplacenta, dont il ne reste qu'une mince bordure *Ep*, — *Avi*, portion interne de l'aire vasculaire, dépourvue de la couche ectodermique (ectoplacenta) qui est restée adhérente à l'utérus et montrant le réseau vasculaire déjà formé; — *Pa*, proamnios; — *Ac*, capuchon caudal de l'amnios. 9 diam

franchement hémoglobique. La cellule sanguine s'est transformée en *hématie primordiale*, volumineuse, sphérique, à noyau arrondi, vésiculeux, à réseau chromatique régulier, sans nucléole. Cette transformation est déjà accomplie sur un grand nombre de cellules à la fin du 9e jour; mais les cellules sanguines primitives et les formes intermédiaires sont nombreuses aussi. Tous ces éléments, à tous

les stades de leur évolution, se multiplient activement par mitose.

A la fin du 9e jour, l'aire vasculaire est complètement formée; ses

Fig. 284. — Embryon de lapin de la fin du 9e jour, semblable à celui représenté fig. 282. Œuf en place, encore adhérent. Coupe transversale passant par les protovertèbres pour montrer les rapports de l'embryon et de l'aire vasculaire avec l'utérus.

D, tissu utérin (décidua); — *G*, crypte glandulaire utérine dont les cellules sont en voie de dégénérescence; — *Ec*, ectoderme de l'œuf, épaissi (ectoplacenta, trophoblaste) et adhérent à la muqueuse utérine dont l'épithélium superficiel a déjà disparu ; il reste adhérent à l'utérus lorsqu'on enlève l'aire vasculaire ; comparez avec les figures 282 et 283 ; — *En*, endoderme ; — *C*, cœlome ; — *S*, splanchnopleure ; — *A*, aorte ; — *Ch*, corde dorsale ; — *R*, repli amniotique latéral ; — *I*, espace intercotylédonaire. 30 diam.

vaisseaux se sont mis en relation avec ceux de l'embryon. Les cellules sanguines sont entraînées jusque dans le cœur où elles arrivent surtout par les deux veines vitellines. L'artère vitelline n'est pas encore visible. A la périphérie de l'aire vasculaire, on voit le sinus marginal, qui s'est formé *in situ*, par différenciation directe des portions les plus extrêmes de l'aire vasculaire ; il communique directement avec le réseau de l'aire vasculaire en des points nombreux.

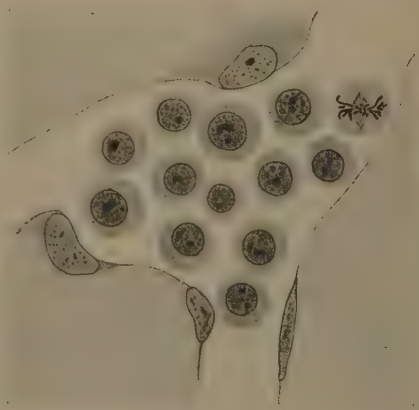


Fig. 285. — Embryon de lapin de la fin du 9e jour. Aire vasculaire vue à plat. Transformation des cellules sanguines primitives en hématies primordiales. 650 diam.

La différenciation des cellules sanguines se poursuit au 10e jour. Les œufs de cet âge sont ouverts comme au 9e jour. En les ouvrant dans l'eau salée à 37°, on pourra observer avec la plus grande facilité, à la loupe, les battements du cœur qui contient un sang rose. L'œuf repose sur les deux saillies de la muqueuse utérine qui forment les cotylédons utérins ;

l'interstice qui les sépare, et au niveau duquel est couché l'embryon, est ordinairement dans l'axe de la corne utérine (1).

Fig. 286. — Embryon de lapin du 9e jour. Aire vasculaire. Deux hématies primordiales en mitose, dans un vaisseau. 940 diam.

A ce stade, une modification importante est apparue. L'embryon se détache de ses membranes ; toute sa portion antérieure (extrémité céphalique, cou, région cardiaque) fait saillie dans la cavité blastodermique ; elle est coiffée d'une fine membrane (capuchon proamniotique ou proamnios) constituée par l'endoderme doublé de la splanchnopleure. Toute cette partie est libre et mobile et flotte dans le liquide vitellin.

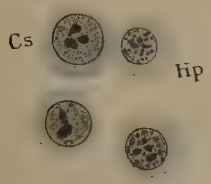


Fig. 287. — Embryon de lapin de la fin du 9e jour. Quatre cellules contiguës montrant les étapes successives de la transformation d'une cellule sanguine primitive (*Cs*) en une hématie primordiale (*Hp*). 940 diam.

A la périphérie de la saillie formée par les cotylédons utérins, on aperçoit le sinus marginal, rempli de sang rose, et qui forme un cercle complet tout autour de l'embryon ; il limite l'aire vasculaire. Dans celle-ci, on voit les deux veines vitellines, ordinairement remplies, dans leur portion distale, d'un liquide encore incolore. A la fin du 10e jour, une artère vitelline se différencie aux dépens des capillaires radiés de l'aire vasculaire et ses ramifications se jettent au pôle postérieur du sinus marginal. Le sang, poussé par les battements du cœur, arrive au sinus marginal par l'artère vitelline et par les capillaires radiés de l'aire vasculaire, dans lesquels il filtre lentement ; du sinus, le sang retourne au cœur par les capillaires du pôle antérieur de l'aire vasculaire et par les

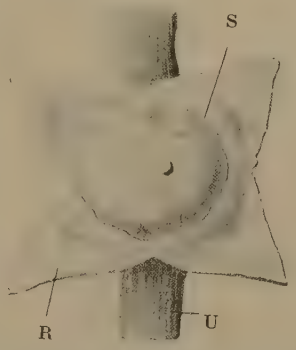


Fig. 288. — Embryon de lapin du 10e jour. Disque germinatif, tel qu'il apparaît lorsqu'on ouvre le renflement utérin dans l'eau salée. L'œuf est ouvert. L'aire vasculaire recouvre la saillie des cotylédons placentaires ; elle est limitée par le sinus marginal, *S*. Au centre, on aperçoit, libre et flottante, la partie antérieure du corps de l'embryon recouverte par le capuchon amniotique, et les deux veines vitellines qui arrivent au cœur. *U*, corne utérine ; *R*, lambeau du renflement utérin, auquel est accolée la mince paroi ovulaire. Légèrement grossi.

(1) De telle sorte qu'en sectionnant le renflement utérin perpendiculairement à l'axe de la corne utérine, on aura chance d'obtenir des coupes transversales de l'embryon.

veines vitellines. Comme le montre la figure 290, les deux veines vitellines représentent une formation spéciale, et non, comme chez le poulet, les extrémités cardiaques de la portion antérieure du sinus marginal.

Si on soulève l'aire vasculaire et qu'on la détache de l'utérus, on aperçoit au-dessous d'elle l'extrémité caudale de l'embryon, tordue en spire et montrant l'allantoïde. Les segments primordiaux sont

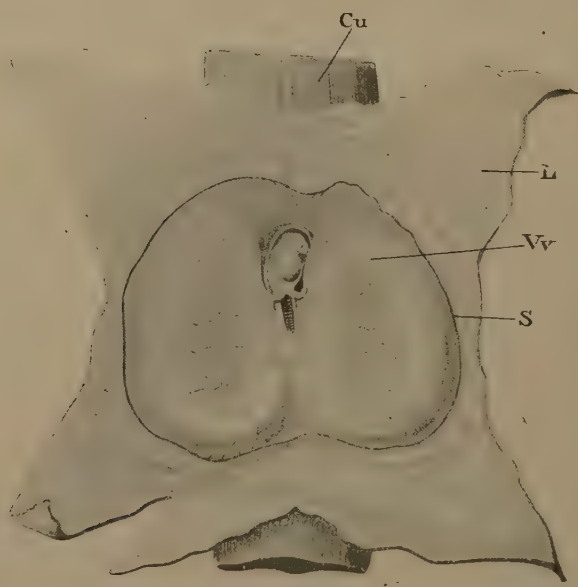


Fig. 289. — Embryon de lapin du 10e jour. Renflement utérin ouvert pour montrer le disque germinatif en place.

Cu, corne utérine ; — *L*, lambeaux du renflement ovulaire ; — *Vv*, veine vitelline gauche ; — *S* sinus marginal. La portion antérieure du corps de l'embryon est représentée ici en extension tandis que dans les figures 288 et 290, elle est figurée en position de flexion. Grossi 3 fois.

bien formés ; à ce moment, à la fin du 10e jour, leur nombre est voisin de 30. La gouttière intestinale est encore largement ouverte dans la cavité de l'œuf qui se confond encore à ce moment avec la cavité de la vésicule ombilicale ; mais l'embryon est libre dans les deux tiers de sa longueur. Cette circonstance fait qu'il n'est pas possible de monter à plat en préparation persistante le disque germinatif entier. Il faut, après fixation (1), détacher l'embryon qui sera

(1) A ce stade, pour que l'embryon soit bien fixé, il faut naturellement laisser agir le fixateur plus longtemps, 3 ou 4 heures pour les mélanges bichromate-sublimé-formol. Après avoir fixé en place l'œuf ouvert, pendant 1 ou 2 heures, on détache l'embryon et on complète sa fixation. On procède de même aux stades suivants (11e, 12e, 13e, 14e jours). A partir du 15e jour, l'embryon est trop gros pour être bien pénétré par les liquides ; on facilite la pénétration en pratiquant, au rasoir, une section transversale au niveau de l'abdomen et une section sagittale au niveau du crâne. Pour les coupes totales topographiques de l'œuf, à tous les stades, les solutions de formol à 10 p. 100 et l'inclusion à la celloïdine donneront de bons résultats.

Fig. 290. — Embryon de lapin du 10e jour.

L'œuf a été ouvert et le disque germinatif, détaché de l'utérus, a été étalé. Il montre sa face interne, endodermique. L'aire vasculaire est complètement formée; elle est limitée en dehors par le sinus marginal, *S*, rempli d'un sang rouge qui lui est apporté par l'ensemble des vaisseaux de l'aire vasculaire, mais surtout par l'artère vitelline, *A*, qui s'épanouit à l'extrémité caudale du disque germinatif. Ce sang retourne au cœur par les vaisseaux de la portion antérieure du disque, qui aboutissent aux deux veines vitellines, *V*. Celles-ci, dans leur portion distale, ne contiennent qu'un plasma sanguin pauvre en hématies et incolore. L'aire vasculaire est formée de deux parties : une partie externe, périphérique, revêtue profondément par le feuillet ectodermique, et qui paraît opaque; une partie interne, centrale, plus transparente, au niveau de laquelle le feuillet ectodermique, qui représente l'ectoplacenta, est resté adhérent à l'utérus. La limite de la déchirure est marquée par une ligne foncée, *E*, reste de l'ectoplacenta. La portion antérieure du corps de l'embryon, coiffée du proamnios, fait fortement saillie dans la cavité de l'œuf; elle est libre, mobile, et flotte dans le liquide vitellin. On voit la vésicule oculaire, la vésicule auditive, le 4e ventricule, la moelle, les arcs branchiaux, le cœur et les premières paires de somites, dont le nombre total est de 30. La partie postérieure du corps de l'embryon, en arrière des veines vitellines, légèrement tordue en spirale, est cachée sous l'aire vasculaire ; on la voit par transparence. Au niveau de l'émergence de l'artère vitelline, on aperçoit la gouttière intestinale, largement ouverte dans la cavité de la vésicule ombilicale qui se confond ici avec la cavité de l'œuf. A ce stade, le foie n'est pas encore formé. C'est l'immense nappe sanguine de l'aire vasculaire qui est le véritable organe hématopoiétique. Le disque germinatif représenté est exactement âgé de 9 jours et 21 heures. Grossi 6 fois et demie

réservé pour des coupes, ensuite colorer et monter la membrane, qui sera, au besoin, sectionnée en deux ou trois larges lambeaux.

L'étude des rapports de l'aire vasculaire et de l'embryon avec la muqueuse utérine au 9e et au 10e jour, sera complétée sur différents œufs par des sections totales comprenant les parois de l'œuf et de l'utérus ; ces coupes sont faites transversalement à l'axe de l'embryon, après inclusion à la paraffine ou à la celloïdine. Elles

Fig. 291. — Embryon de lapin du 10e jour, détaché avec un lambeau de l'aire vasculaire (Av) pour montrer ses rapports avec cette membrane.

Vvd, veine vitelline droite ; — *Vvg*, veine vitelline gauche ; — *Al*, allantoïde ; — *Pa*, proamnios, coiffant l'extrémité céphalique de l'embryon.

Fig. 292. — Embryon de lapin du 10e jour. Même œuf que figures 290 et 291. Aspect des cotylédons utérins lorsque l'aire vasculaire a été détachée avec l'embryon. L'ectoderme chorial (ectoplacenta) est resté adhérent; mais il n'est pas visible. Le sinus marginal correspondait à peu près au pourtour des cotylédons. Grossi environ 2 fois et demie.

montrent l'ectoderme, transformé en syncytium, végétant et s'enfonçant dans les cryptes de la muqueuse utérine.

Dans les vaisseaux de l'aire vasculaire, on voit, pendant le 10e jour, les cellules sanguines se multiplier avec activité. Les *hématies primordiales*, chargées d'hémoglobine, sont plus nombreuses qu'au 9e ; mais à côté d'elles, on observe de nombreuses *cellules sanguines primitives* et tous les stades de leur transformation et de leur multiplication. Dans le cœur et les vaisseaux de l'embryon, les hématies primordiales sont plus nombreuses que les stades non hémoglobiques, que l'on trouve au contraire en abondance dans les vaisseaux de l'aire vasculaire.

Hématopoièse dans le sac vitellin. Hématies définitives. — Pendant une grande partie du développement, les vaisseaux de la vésicule ombilicale ou sac vitellin, chez le lapin, produisent des cellules sanguines et jouent le rôle d'un véritable organe hématopoiétique. Aussi l'étude de l'aire vasculaire doit-elle être poursuivie dans les stades suivants ; elle donne, ici, des renseignements beaucoup plus importants que l'étude directe du sang du cœur.

A partir du 12e jour, l'œuf subit une modification qu'il est indispensable de connaître lorsqu'on veut recueillir les membranes vasculaires de l'embryon. La voûte de la vésicule ombilicale (1) commence à se déprimer, à tomber dans l'intérieur de la cavité, comme si elle fléchissait sous le poids de l'embryon (voir fig. 302).

L'hémisphère supérieur de la vésicule s'invagine ainsi progressivement dans l'hémisphère inférieur qui commence à se résorber et finit par disparaître, de sorte qu'à partir du milieu de la gestation (15e jour), en ouvrant le renflement utérin du côté antimésométrique, on tombe immédiatement sur une membrane richement vascularisée (chorion secondaire) qui forme la paroi externe de l'œuf et qui n'est autre chose que l'ancienne voûte de la vésicule ombilicale dont la cavité n'existe plus. Les vaisseaux de ce chorion sont tout simplement ceux de l'aire vasculaire. Au-dessous, on trouve l'amnios et l'allantoïde.

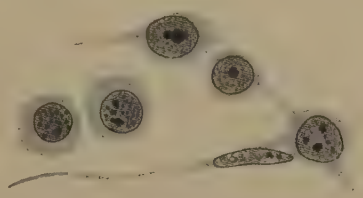


Fig. 293. — Embryon de lapin du 10e jour. Aire vasculaire examinée à plat. Transformation de cellules endothéliales en cellules sanguines primitives. 940 diam.

Le sinus marginal, qui a conservé à peu près sa situation primordiale, est très rapproché du placenta et s'anastomose avec les vaisseaux allantoïdiens qui s'avancent jusqu'à ce niveau. A tous les stades du développement, on fixera des lambeaux de la paroi vasculaire de la vésicule ombilicale, qu'on montera à plat après les avoir colorés ; sur d'autres fragments, on pratiquera des coupes de cette paroi. Enfin, l'étude du développement du sang sera complétée par des préparations de sang du cœur et par des coupes de l'embryon.

Pendant les 11e, 12e, 13e, 14e, 15e et 16e jours, les vaisseaux du sac vitellin continuent à fabriquer des hématies primordiales aux dépens des cellules sanguines primitives incolores. Cette fabrication active s'accompagnent de phénomènes accessoires : éléments dégénérés, formation de cellules géantes, rappelant parfois les mégacaryocytes et capables de subir la caryocinèse multiple comme dans la moelle osseuse. Ces éléments sont contenus dans le sang des capillaires.

(1) Formée par l'endoderme doublé du feuillet splanchnique du cœlome extra-embryonnaire avec les vaisseaux de l'aire vasculaire entre les deux.

Les *hématies primordiales* sont de plus en plus chargées d'hémoglobine ; leur noyau devient en même temps plus petit. Enfin on constate, au moins sur un certain nombre d'entre elles, l'aplatissement de la cellule, qui devient discoïde.

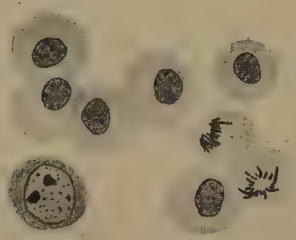


Fig. 294. — Embryon de lapin du 14e jour. Aire vasculaire. Groupe d'hématies primordiales. Elles sont riches en hémoglobine et leur noyau est relativement petit. L'une d'elles est en mitose. A gauche en bas, une cellule sanguine primitive. 1.000 diam.

Ces gros éléments hémoglobiques, qui constituent les globules rouges du jeune embryon ne sont pas destinés à subsister. A un stade assez fixe de la vie embryonnaire, qui varie suivant les espèces, ils cessent de se multiplier et subissent une dégénérescence de leur noyau. Ce phénomène se voit chez tous les mammifères. Chez le lapin, on peut le constater dans l'aire vasculaire comme dans le sang de l'embryon. Il est plus frappant seulement dans le sang de l'embryon, parce que celui-ci contient proportionnellement beaucoup plus de cellules hémoglobiques que de cellules sanguines incolores. La charpente colorable du noyau disparaît ; la chromatine se dissout dans le suc nucléaire ; le noyau tout entier est transformé en un petit globule colorable, homogène, qui perd ses propriétés tinctoriales ; il apparaît souvent vacuolisé, le champ nucléaire limité par une mince croûtelle de basichromatine. Dans un certain nombre d'éléments, le noyau disparaît même complètement et forme des hématies primordiales discoïdes et sans noyau (1) ;

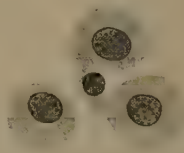


Fig. 295. — Embryon de lapin du 14e jour. Réseau vasculaire du sac vitellin. Hématies primordiales ; l'une d'elles, vue de champ, apparaît aplatie et discoïde. 930 diam.

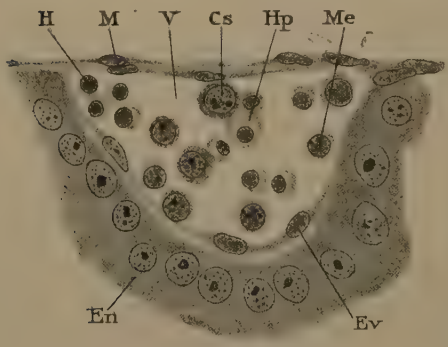


Fig. 296. — Embryon de lapin du 14e jour. Coupe du sac vitellin.

En, endoderme ; — *M*, mésoderme ; — *Ev*, endothélium vasculaire ; — *V*, cavité vasculaire ; — *Cs*, cellule sanguine primitive ; — *Hp*, hématie primordiale ; — *Me*, mégaloblaste ; — *H*, normoblaste. 750 diam.

(1) Ces *hématies primordiales* sans noyau sont peu nombreuses et disparaissent rapidement. Elles ne sont pas destinées à jouer un rôle important dans la respiration de l'embryon ; mais elles sont intéressantes à connaître, parce qu'elles montrent, déjà à cette pé-

mais dans la plupart, la dégénérescence nucléaire ne va pas aussi loin. En tout cas, ces cellules sont vouées à une destruction rapide. Elles sont transitoires et comparables ainsi à ces organes embryonnaires qui n'ont qu'une fonction éphémère et sont remplacés par d'autres au cours du développement de l'organisme.

Fig. 297. — Embryon de lapin du 16e jour. Aire vasculaire examinée à plat. Bichromate-sublimé-formol; éosine-orange-toluidine. Groupe de cellules montrant, les unes à côté des autres, les deux générations d'hématies et leurs stades d'évolution.

Cs, *Cs*, cellules sanguines primitives; — *Hp*, hématie primordiale; *L*, *L*, cellules lymphoïdes indifférentes nées de la multiplication des cellules sanguines primitives; — *M*, mégaloblaste né de la transformation des précédentes; — *Hs*, hématie secondaire (normoblaste); — *H*, hématie définitive. 940 diam.

Les *hématies primordiales* ne représentent pas, en effet, les cellules mères des hématies définitives. A cette première génération de cellules sanguines succède une deuxième génération formée par des globules rouges nucléés plus petits : les *hématies secondaires*. Ces nouveaux globules, chez le lapin, apparaissent dans les vaisseaux du sac vitellin, au 13e jour. Ils sont bien visibles au 14e jour. A ce moment, les capillaires du sac vitellin sont bourrés de cellules sanguines sans hémoglobine qui se multiplient activement. Cette multiplication intense et rapide par mitose donne lieu à la formation d'éléments plus petits, sans hémoglobine également, tout à fait semblables aux grosses cellules sanguines primitives et qui subissent la même évolution. Les éléments hémoglobiques qui résultent de leur transformation sont les *hématies secondaires*. On trouve, bien entendu, dans cette nouvelle génération de cellules, tous les stades intermédiaires de la transformation du noyau et du cytoplasme. Les stades pauvres en hémoglobine sont les *érythroblastes secondaires* ou *mégaloblastes*. Les stades plus avancés dans leur évolution répondent aux *normoblastes* à noyau intact puis à noyau pycnotique. Les stades lymphoïdes, sans hémoglobine, résultant de la division des cellules sanguines primitives sont les *cellules sanguines indifférentes de 2e génération*.

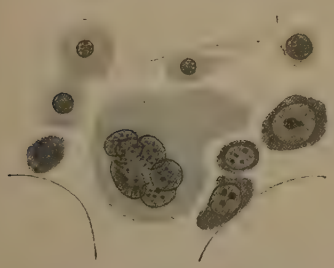


Fig. 298. — Embryon de lapin du 16e jour. Réseau vasculaire sanguin du sac vitellin. Cellule géante. 830 diam.

riode, un effort de l'organisme vers une évolution qui, plus tard, sera complète et définitive.

Ces hématies secondaires, au début de leur évolution, sont encore capables de se multiplier par mitose ; mais lorsque leur transformation hémoglobique est complète, elles subissent assez rapidement une dégénérescence de leur noyau qui aboutit à sa disparition et les transforme en *hématies définitives* sans noyau. La manière dont se fait cette disparition du noyau a été très discutée, et certains détails de cette transformation sont encore mal connus.

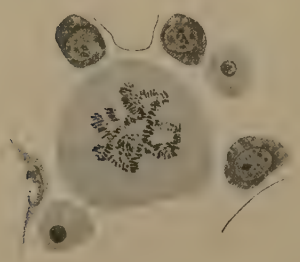


Fig. 299. — Embryon de lapin du 16e jour. Réseau vasculaire du sac vitellin. Cellule géante montrant une mitose pluripolaire ; autour d'elle, trois cellules sanguines primitives et deux hématies primordiales. 830 diam.

Mode de disparition du noyau. — Le fait primordial, c'est la dégénérescence nucléaire. Le noyau subit une atrophie progressive : il diminue de volume ; le réseau chromatique disparaît ; la chromatine se dissout dans le suc nucléaire (homogénéisation, pycnose, chromatolyse). Le noyau se transforme en un petit globule chromatique fortement coloré par les couleurs basiques. La basichromatine ainsi en dissolution subit une transformation dans sa constitution chimique, car, assez brusquement, elle cesse de se colorer par les couleurs nucléaires habituelles ; elle ne se colore plus qu'à la périphérie ou bien ne prend plus que la safranine dans les colorations combinées hématoxyline-safranine. Très rapidement, elle perd toute affinité pour les couleurs nucléaires, prend seulement les couleurs plasmatiques comme l'éosine et disparaît. Dans beaucoup de ces cellules, avant que le noyau subisse cette sorte de dissolution, et alors qu'il est réduit à un petit globule de consistance huileuse, colorable d'une façon homogène par l'hématoxyline, il est expulsé. Mais la dissolution est complète dans la plupart des hématies. A la suite de ces différents phénomènes, il peut persister un *reste nucléaire chromatique* ou plusieurs résidus chromatiques qui ne tardent pas à disparaître par dissolution.

Fig. 300. — Disparition du noyau dans les hématies primordiales. Embryon de cobaye de 16 millimètres ; sang du cœur. 750 diam.

Dans les globules dont le noyau est en train de subir la transformation de la basichromatine en oxychromatine, le noyau peut apparaître sous forme d'un mince anneau colorable par l'hématoxyline ou les bleus basiques. Enfin la pycnose du noyau peut donner lieu à

des aspects bourgeonnants, en trèfle, en rosace, très communs dans les tissus hémopoiétiques et surtout dans le sang pathologique, mais qui, à vrai dire, sont beaucoup plus rares au cours du développement embryonnaire. La fragmentation n'intervient guère dans la disparition normale du noyau.

Les phénomènes que nous venons de décrire chez le lapin se voient aussi chez les autres espèces de mammifères.

Dans la plupart des hématies, la transformation de la basichromatine du noyau pycnotique paraît se faire très rapidement. La persistance d'un reste nucléaire chromatique n'est donc pas un fait général; le plus souvent, la transformation des affinités chromatiques est totale et généralisée (1). Quant aux granulations basophiles des hématies, elles ne semblent avoir aucun rapport ni avec la chromatine ni avec les autres substances du noyau (2).

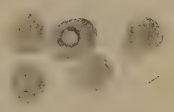


Fig. 301. — Disparition du noyau dans les hématies définitives. Embryon de cobaye de 20 millimètres ; sang du cœur. 750 diam.

La diminution de volume graduelle du noyau dans les hématies primordiales au fur et à mesure que le cytoplasme se charge d'hémoglobine, la disparition du noyau, surtout par dissolution dans le corps cellulaire, permettent de penser que des matériaux d'origine nucléaire servent à la formation du pigment sanguin. Cette opinion n'est pas en désaccord avec ce que nous savons de la constitution chimique du noyau cellulaire et de l'hémoglobine.

Les deux générations d'hématies. — Il existe ainsi, dans le sang des embryons de mammifères, au cours du développement, deux générations distinctes de cellules hémoglobiques : la première formée par des cellules volumineuses représentant les premières hématies de l'embryon ; elles subissent, à un certain stade de leur évolution, une atrophie de leur noyau et disparaissent. On retrouve leurs restes dégénérés dans l'intérieur des cellules endothéliales des capillaires du sac vitellin et du foie, qui les ont phagocytés. La seconde génération d'hématies est formée par des cellules nucléées plus

(1) Certains auteurs admettent encore qu'il persiste, dans l'hématie, un résidu nucléaire figuré distinct des restes nucléaires chromatiques ; il est plus probable que les substances nucléaires se sont mélangées à celles du corps cellulaire et qu'elles sont combinées à celles du stroma. Pour l'examen des différentes théories émises sur l'origine des hématies des mammifères voyez : Jolly, *Archives d'An. micr.* IX, 1907.

(2) Voyez ch. II et Jolly, *l. c.* 1907. On peut observer dans le sang des embryons, des globules rouges nucléés à noyau intact et même en mitose, dont le cytoplasme porte des granulations basophiles.

petites ; elles perdent leur noyau et se transforment en hématies définitives (1).

Dans les vaisseaux du sac vitellin, du 12e au 16e jour, et même plus tard, on observe à côté les unes des autres les deux générations d'hématies avec leurs formes-mères sans hémoglobine, les formes intermédiaires, et les hématies définitives. Mais les hématies primordiales disparaissent progressivement et leurs formes-mères sont aussi plus rares. Dans le sang de la circulation générale, on observe aussi, pendant quelque temps, des hématies primordiales, des hématies secondaires et des hématies définitives ; mais les hématies primordiales ont presque toutes un noyau en pycnose. On retrouve leurs restes dégénérés et phagocytés dans les cellules endothéliales vasculaires. Chez les espèces de mammifères dont le sac vitellin, contrairement à ce qui se voit chez le lapin, ne joue que peu de temps un rôle dans l'hématopoièse, la formation des hématies secondai-

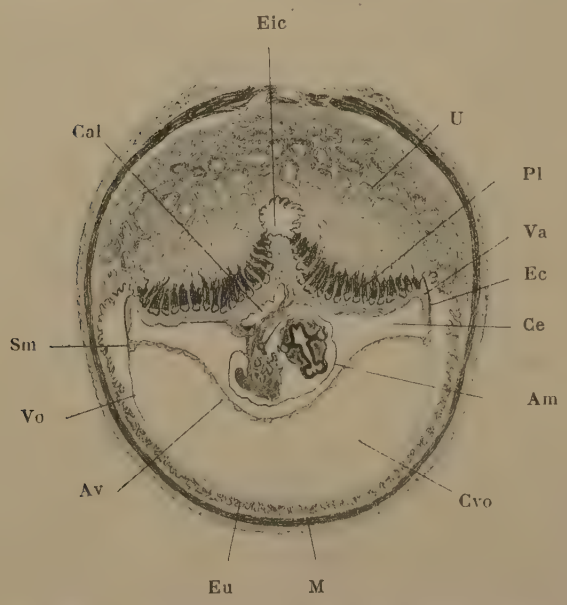


Fig. 302. — Œuf de lapin du 14e jour. Coupe du renflement utérin, transversale par rapport à l'axe de la corne utérine, pour montrer les rapports de l'aire vasculaire au moment où la cavité de la vésicule ombilicale (CVO) commence à disparaître.

Vo, paroi de la vésicule ombilicale qui dans tout l'hémisphère distal, est atrophiée ; — *Av*, aire vasculaire, infléchie sous la poussée de l'embryon et dont les rapports vont changer ; — *Sm*, sinus marginal ; — *Am*, amnios enveloppant l'embryon ; — *Cal*, cavité de l'allantoïde ; — *Ce*, cœlome extra-embryonnaire ; — *Ec*, ectoderme chorial ; — *Va*, couche mésodermique contenant les vaisseaux allantoïdiens ; — *Eu*, épithélium utérin ; — *M*, paroi musculaire de l'utérus ; — *Eic*, espace intercotylédonaire. 4 diam. D'après Mathias Duval.

(1) Jolly, *S. de Biologie*, 25 mars et 1er avril 1905. *C. R. de l'Ass. des Anatomistes*, Genève, août 1905, et *Archives d'An. microscopique*, IX, juin 1907 ; — Maximow, *Folia hæmatologica*, IV, 1907, et *Archiv f. mikr. Anatomie*, LXXIII, 1909.

Les métrocytes I et II de Engel (*Archiv. f. mikr. An.*, LIII, 1898 et LIV, 1899) ne correspondent pas aux deux générations d'hématies, mais aux deux stades principaux de l'évolution des hématies primordiales. Celles-ci sont parfois nommées encore : érythroblastes primitifs. Le terme d'hématogonie ou d'hémogonie a été parfois appliqué aux cellules sanguines primitives.

res est en rapport avec l'apparition des différents tissus hématopoiétiques ; on les trouve d'abord nombreuses dans les capillaires du foie, puis, plus tard, elles sont fabriquées par la rate et par la moelle osseuse.

Chez le lapin, au contraire, la fonction hématopoiétique du sac vitellin est considérable et persiste longtemps. Au 14e jour, la paroi endodermique du sac est soulevée par la saillie que forment les vaisseaux. Sur les coupes transversales du sac vitellin, on voit l'endoderme former des franges qui font saillie dans la cavité ombilicale (1), et qui enveloppent les vaisseaux. Dans ceux-ci, il est facile de reconnaître les différents types cellulaires que nous avons décrits plus haut. Les cellules endodermiques sont alors très hautes, et elles contiennent des grains vitellins (2). Ces dispositions paraissent être en rapport avec la nutrition de l'embryon. Il est probable que les Mammifères descendent d'animaux possédant des œufs riches en vitellus et se développant sans placenta intermédiaire. Ces vaisseaux vitellins étaient destinés à absorber le vitellus comme chez les Oiseaux. Chez les Mammifères, le vitellus a disparu et n'est plus représenté que par un liquide albumineux ; mais la richesse des vaisseaux vitellins et les franges endodermiques qui les enveloppent sont des indices certains de cette fonction ancienne. Nous retrouverons ces dispositions très accusées chez l'embryon du poulet.

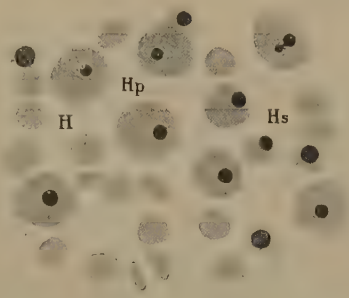


Fig. 303. — Embryon de lapin du 17e jour. Sang du cœur montrant, à côté les unes des autres, les hématies des deux générations.

Hp, hématies primordiales, énormes, avec leur noyau pycnotique prêt à disparaître ; — *Hs*, hématies secondaires ; — *H*, hématies définitives, sans noyau. 500 diam.

Apparition des premiers leucocytes. — Les cellules sanguines primitives nées des îlots sanguins se transforment progressivement en hématies. Elles continuent à se multiplier activement et à donner des cellules semblables, plus petites, de sorte que, pendant longtemps, on trouve, dans les vaisseaux du sac vitellin du lapin, à côté des hématies nucléées et des hématies définitives, des cellules nombreuses, d'aspect lymphoïde, à protoplasma basophile, qui ressemblent beaucoup aux cellules lymphoïdes germinales qui se forment en

1) Qui à ce stade commence à s'effacer (voir la fig. 302).
(2) Henneguy, *S. de Biologie*, 2 avril 1892.

même temps dans le mésenchyme et qui sont la source de nouveaux foyers hémopoiétiques.

Un certain nombre de ces cellules lymphoïdes sont capables de former des lymphocytes sanguins (1). En réalité cependant, presque toutes ces cellules sont destinées à former des hématies. Les leucocytes définitifs (lymphocytes vrais et leucocytes granuleux) n'existent pas à ce moment dans le sang de l'embryon ; ils y apparaissent seulement plus tard (2) et ont une origine différente ; ils ne se forment pas dans le sang des vaisseaux vitellins ; ils proviennent du mésenchyme et des foyers hémopoiétiques de l'embryon (3).

Pendant que le feuillet mésodermique fabrique, en dehors de l'embryon, dans la paroi du sac vitellin, les premiers vaisseaux et les premières cellules sanguines, sa portion axiale, embryonnaire, donne naissance à de nombreuses cellules qui se répandent dans la tête, entre l'ectoderme et les vésicules cérébrales et plus tard dans le tronc, le long des gros vaisseaux. Ce tissu, formé de cellules étoilées lâchement unies, est le mésenchyne ou tissu conjonctif embryonnaire. Chez des embryons de lapin de 10 à 12 jours, on voit certaines de ces cellules se transformer : elles se contractent, leurs prolongements disparaissent, elles deviennent libres et globuleuses, leur protoplasma apparaît basophile, leur noyau nucléolé ; elles se transforment ainsi en *cellules lymphoïdes primitives* ou *germinales*. Nous suivrons plus tard (ch. XI) ces phénomènes jusque dans les stades avancés de la vie embryonnaire ; mais ils ne tardent pas à se localiser et à former, en certains points, le *tissu lymphoïde* auquel est confié dorénavant le soin de former des leucocytes. Ces cellules lymphoïdes primitives sont très voisines, par leur aspect, des cellules sanguines primitives de l'aire vasculaire et très semblables aussi aux cellules lymphoïdes germinales (leucoblastes et myéloblastes) qui se forment plus tard dans le foie, la rate et la moelle osseuse. Ici, dans le mésenchyme, elles sont destinées surtout à former des lymphocytes ; mais dès ce moment, chez des embryons de lapin de 12 à 14 jours, on peut les voir former des cellules analogues aux myélocytes granuleux, et même, exceptionnellement, des hématies (4).

Dans les vaisseaux de l'aire vasculaire, chez des embryons de lapin du 9e et du 10e jour, les cellules endothéliales vasculaires sont capables de former des cellules sanguines primitives et par consé-

(1) Maximow, *Archiv. f. mikr. Anatomie*, LXXIII, 1909.
(2) Jolly et Acuna, *Archives d'An. micr.*, VII, janvier 1905.
(3) Van der Stricht, *Archives de Biologie*, XII, 1892 ; — Saxer, *An. Hefte*, VI, 1896.
(4) Saxer, *An. Hefte*, VI, 1896 ; — Maximow, *Archiv. f. mik. Anatomie*, LXXIII, 1909.

quent des hématies. Dans l'embryon, à ces jeunes stades, l'endothélium des gros vaisseaux semble, de la même manière, capable de former de grosses cellules lymphoïdes, qui deviennent libres dans la circulation ; mais ce phénomène ne dure pas longtemps et il paraît exceptionnel.

Distribution des cellules sanguines dans les vaisseaux. Début de l'hématopoièse dans l'embryon. — Les foyers lymphoïdes du mésenchyme embryonnaire n'ont, dans les jeunes stades, qu'un rôle peu important. Les leucocytes granuleux, qu'ils forment du reste en petit nombre, n'apparaissent pas encore dans le sang à cette époque de la vie. Le véritable foyer hémopoiétique est à ce stade, surtout chez le lapin, le réseau vasculaire du sac vitellin (vésicule ombilicale). Ce riche réseau, comme plus tard celui du foie, offre des conditions favorables à la multiplication et à l'évolution des cellules sanguines ; dans les vaisseaux où le cours du sang est rapide, dans les ramifications artérielles, les cellules hémoglobiques, les hématies dominent ; dans les petites veines et les capillaires où la circulation est plus lente, les formes-mères lymphoïdes et les formes intermédiaires, immatures, sont toujours plus abondantes ; elles sont toujours plus nombreuses que dans le sang du cœur et des vaisseaux de l'embryon ; l'évolution du sang paraît toujours plus avancée dans le sang du cœur que dans le sang de la vésicule ombilicale.

Chez le lapin, la fonction hématopoiétique du réseau vitellin reste active jusque vers le 20e jour ; elle persiste même plus longtemps, mais atténuée ; le réseau vitellin existe jusqu'à la fin de la parturition. Vers le 14e-15e jour, le foie commence à intervenir, et dans les dernières semaines de la vie intrautérine, c'est lui qui joue le rôle important ; la rate, et la moelle osseuse n'interviennent qu'ensuite. Chez la plupart des mammifères, chez l'homme en particulier, le rôle hémopoiétique de la vésicule ombilicale dure peu de temps ; elle s'atrophie de bonne heure. Ici encore, c'est d'abord le foie, puis plus tard, la rate et la moelle osseuse qui remplissent cette tâche.

ÉBAUCHES SANGUINES DU COBAYE

Bien qu'il soit de structure compliquée et qu'il ait subi, par suite de l'invagination des feuillets, de profondes modifications, l'œuf du cobaye se trouve, pour l'étude des ébauches sanguines, un objet très intéressant.

Chez le cobaye, l'accouplement et l'ovulation se produisent aussitôt la parturition, et en général, dans la nuit consécutive à la mise-bas (1). Il est donc très facile, en isolant des femelles pleines et en observant la parturition, d'obtenir des fécondations à date précise. La durée de la gestation est d'environ 60 jours ; les stades intéressants pour l'étude du développement des premières cellules sanguines sont le 13e, le 14e et le 15e jour.

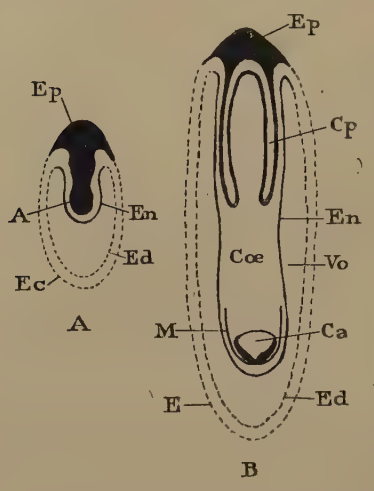


Fig. 304. — Œuf de cobaye; coupes axiales totales. Figures diagrammatiques destinées à expliquer l'invagination de l'œuf aboutissant à l'inversion des feuillets. Les membranes disparues ou en voie de disparition sont figurées par une ligne pointillée.

A, œuf du 7e jour ; — *Ep*, ectoplacenta ; — *A*, masse amniotique ectodermique refoulant l'endoderme proximal *En* ; — *Ed*, endoderme distal ; — *Ec*, ectoderme ; — *B*, œuf du 12e jour, stade d'apparition du mésoderme ; — *Ep*, ectoplacenta ; — *Cp*, cavité ectoplacentaire ; — *Cœ*, cœlome extra-embryonnaire ; — *Ca*, vésicule amniotique ; — *M*, mésoderme ; — *Vo*, cavité (virtuelle) de la vésicule ombilicale ; — *En*, endoderme proximal ; — *Ed*, endoderme distal ; — *E*, ectoderme de l'œuf.

L'œuf du cobaye, comparé à celui du lapin, présente des différences considérables. D'une part, il est enveloppé par un renflement de la muqueuse utérine qui lui constitue une paroi très épaisse (caduque réfléchie) ; d'autre part, l'œuf subit, tout au début de son développement, au moment de la différenciation des feuillets, une sorte d'invagination, comparable à celle de la vésicule ombilicale du lapin, mais beaucoup plus précoce et plus intense, de sorte que la cavité de la vésicule ombilicale a depuis longtemps disparu lorsque l'embryon se forme. Celui-ci apparaît à la surface de l'œuf, dans une position paradoxale, la gouttière intestinale en dehors, la gouttière médullaire en dedans, vers la cavité de l'œuf ; c'est l'ensemble de ces phénomènes qu'on nomme inversion des feuillets (2).

La segmentation de l'œuf commence dans la trompe où on peut le trouver déjà quelques heures après l'accouplement. Au 4e jour, l'œuf arrive dans l'utérus et continue à se segmenter. Au 7e jour, on le trouve enfoncé dans un renflement de la muqueuse utérine. C'est à ce moment que se produisent les modifications profondes qui aboutissent à l'invagination précoce de l'œuf et à la disparition de la cavité de la vésicule ombilicale et de sa paroi externe. L'œuf a pris alors une forme cylindrique ; il occupe le centre du renflement utérin, et son axe est perpendiculaire à celui de la corne utérine. L'ectoderme

(1) L'accouplement se fait en général quelques heures après le part qui a lieu souvent la nuit. Quelques jours après, l'accouplement n'est plus possible. En général l'accouplement précède la rupture folliculaire sans en être la cause. La durée de la gestation est de 9 semaines. Voir Bischoff, *Entwickelungsgeschichte der Meerschweinchens, Giessen*, 1852. id. *Neue Beobachtungen zur Entwickelungsgeschichte, Abh. d. K. bayer. AK. d. Wiss. München* 1866 ; — Rubaschkin, *An. Hefte* 1905 ; — Lams, *Archives de Biologie*, XXVIII, 1913.

(2) Selenka, *Studien über Entwickelungsgechichte der Thiere* III Heft. Wiesbaden, 1884 ; — Mathias Duval, *J. de l'Anatomie*, 1890.

chorial s'est épaissi : il a formé, à l'un des pôles, l'ectoplacenta (trophoblaste), à l'autre, la vésicule amniotique. Dans tout le reste de son étendue, la paroi de l'œuf n'est plus constituée que par une couche unique de cellules endodermiques représentant la paroi interne de la vésicule ombilicale. Le mésoderme n'existe pas encore ; il apparaît au 12e jour.

Pour recueillir les œufs du 13e et du 14e jour, et observer la première apparition des ébauches sanguines, voici comment il faut procéder : Le renflement utérin est fixé au fond d'un petit cristallisoir, contenant de l'eau salée à 8 p. 1.000, face mésométrique en haut. Avec une pince et de fins ciseaux, on l'attaque, sous la loupe, avec de grandes précautions, du côté du mésométrium. L'œuf fait hernie ; l'eau salée est remplacée par le fixateur, mélange bichromate-sublimé-formol, qu'on laisse agir pendant 1 heure et demie à 2 heures. On obtient ainsi des œufs isolés et intacts, dont la paroi est fixée dans son état de tension (1).

Fig. 305. — Œuf de cobaye du 13e jour extrait du renflement utérin. L'extrémité supérieure, acuminée, montre le disque germinatif avec la ligne primitive qui apparaît sur la figure comme une ligne claire. L'anneau qui sépare le cylindre ovulaire en deux portions correspond au repli de la cavité ectoplacentaire. Comparez avec la figure précédente. A ce stade, le mésoderme est apparu, mais les ébauches sanguines ne sont pas encore formées. 12 diam.

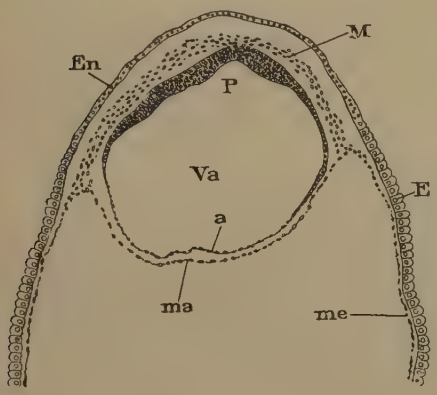


Fig. 306. — Œuf de cobaye du 13e jour. Coupe du pôle embryonnaire sectionnant transversalement la ligne primitive dans sa moitié inférieure ou caudale.

Va, vésicule amniotique ou médullo-amniotique ; — *P*, gouttière primitive ; — *M*, mésoderme se détachant de chaque côté de la ligne primitive ; — *En*, endoderme embryonnaire ; — *E*, endoderme extra-embryonnaire (feuillet interne de la vésicule ombilicale) ; — *me*, mésoderme extra-embryonnaire aux dépens duquel vont se former les premières ébauches sanguines ; — *a*, amnios ; — *ma*, feuillet mésodermique tapissant l'amnios. 80 diam.

Examiné à la loupe, l'œuf du 13e jour apparaît cylindrique et formé de deux parties : une portion à surface irrégulière, qui était adhérente à l'utérus, une portion à surface lisse, libre, plus longue que la précédente. A la limite de ces deux portions, on aperçoit un mince anneau au niveau duquel l'œuf est un peu étranglé et qui correspond au repli de la cavité ectoplacentaire invaginée.

Au sommet de la portion libre de l'œuf, on aperçoit une portion plus opaque qui correspond à la vésicule amniotique ; à la surface de ce pôle, tourné vers la face antérieure de l'œuf, on voit le disque embryonnaire au milieu duquel on aperçoit déjà distinctement une ligne primitive.

(1) Ce qu'on isole ainsi, c'est naturellement la seule portion invaginée de l'œuf. On peut aussi, pour l'isoler, fixer le renflement utérin en entier en l'immergeant pendant douze heures dans le mélange fixateur ; on le dissèque ensuite avec précaution.

On n'aperçoit encore, à ce moment, aucun îlot sanguin ; mais le mésoderme est déjà développé. Sur les coupes longitudinales transverses passant par la ligne primitive, on l'aperçoit comme un mince feuillet, parti du disque embryonnaire, de chaque côté de la ligne primitive, et tapissant la face profonde de l'endoderme ; il s'avance jusqu'à la moitié de la hauteur de l'œuf, sans atteindre la voûte ectoplacentaire. Cette lame mésodermique dans sa portion extraembryonnaire est formée d'une couche unique et continue de cellules aplaties et anastomosées étroitement qui, sur les coupes, apparaissent fusiformes. On n'y voit d'abord aucune différenciation. A la fin du 13e jour, cette lame mésodermique commence à former, par prolifération, en différents points, et à une certaine distance de l'embryon, de petits groupes cellulaires qui s'insinuent entre l'endoderme et le mésoderme. Ces groupes cellulaires sont les premières ébauches sanguines ; elles sont très nettes au 14e jour (1).

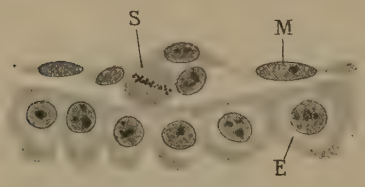


Fig. 307. — Œuf de cobaye du 13e jour. Coupe de la région qui entoure le disque germinatif ; point correspondant à *me* dans la figure précédente ; Première apparition d'une ébauche sanguine, *S*. Les cellules formées par la prolifération localisée de la lame mésodermique (*M*) s'insinuent entre elle et l'endoderme (*E*) et forment les cordons sanguins ou mésoblastiques. 525 diam.

L'œuf du cobaye du 14e jour a la forme d'un cylindre massif ou d'un ovoïde. Son grand axe atteint 4 à 5 millimètres de long. Comme au 13e jour, il est divisé par le bourrelet ectodermique en deux parties. Au sommet de la portion libre, le disque embryonnaire a la forme d'un écusson piriforme dont la portion acuminée (pôle caudal) tournée vers la face antérieure de l'œuf, est terminée par un minuscule bouton, l'allantoïde, qui proémine dans la cavité de l'œuf. Par transparence, on aperçoit la vésicule amniotique qui, elle aussi, proémine dans la cavité de l'œuf. L'axe du disque embryonnaire est occupé par la ligne primitive et par le

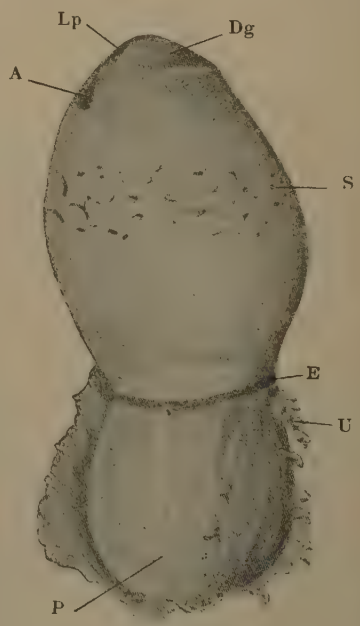


Fig. 308. — Œuf de cobaye du 14e jour extrait de l'utérus et vu par sa face antéro-externe gauche.

Dg, disque germinatif ; — *Lp*, ligne primitive ; — *A*, bourgeon allantoïdien vu par transparence, et qui proémine dans la cavité de l'œuf (cœlome extra-embryonnaire) ; — *S*, réseau des cordons sanguins ; — *E*, bourrelet ectodermique formé par le repli de la cavité ectoplacentaire ; — *P*, pôle placentaire de l'œuf ; — *U*, débris utérins. 15 diam.

(1) Jolly, *S. de Biologie*, 23 novembre 1918 et *Ass. des An.*, Gand, 1922.

prolongement céphalique. Il n'existe encore aucun début de segmentation.

En dehors du disque embryonnaire, on aperçoit, avec une forte loupe, ou, mieux encore, avec un microscope binoculaire, un élégant réseau dont les mailles, contenues dans la paroi, s'étalent transversalement tout autour de l'œuf. Ce réseau est formé par les ébauches

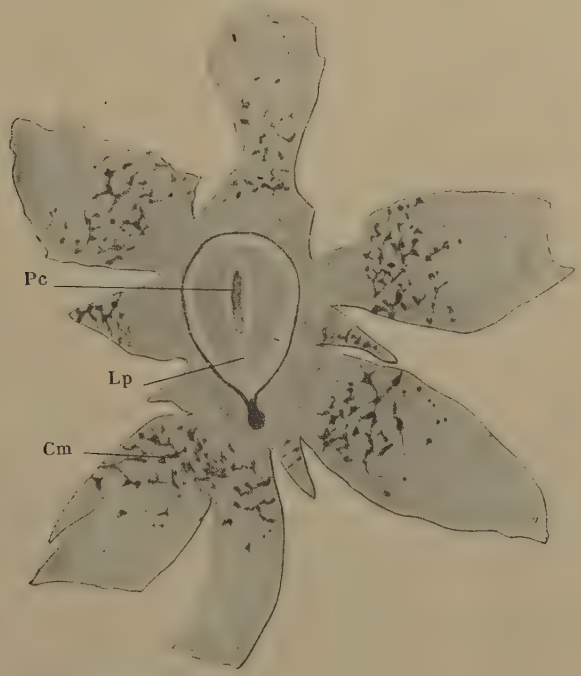


Fig. 309. — Œuf de cobaye du 14e jour. Pôle embryonnaire de l'œuf découpé et étalé à plat et montrant au centre le disque germinatif avec la ligne primitive (*Lp*), le prolongement céphalique (*Pc*) creusé du canal chordal, et du côté caudal, le bourgeon allantoïdien. Le disque embryonnaire est entouré, à une certaine distance, par le réseau des cordons mésoblastiques (*Cm*) ou cordons sanguins. 15 diam.

sanguines qui ont l'aspect de cordons cellulaires ; ce sont les *cordons mésoblastiques* dans lesquels se forment les premières cellules sanguines. Ces cordons, situés entre l'endoderme et le mésoderme représentent une différenciation secondaire du mésoderme qui s'est effectuée dans la dernière partie du 13e jour.

Au niveau du réseau des cordons mésoblastiques, la paroi ovulaire est d'une extrême minceur et d'une grande transparence : elle n'est formée, en effet, que par l'endoderme et le mésoderme, par deux couches cellulaires entre lesquelles proéminent les minces cor-

dons. Cette circonstance fait de l'œuf du cobaye un objet particulièrement favorable pour observer, sur des lambeaux colorés et montés à plat, la différenciation des cellules sanguines. On peut aussi obtenir des préparations dans lesquelles le disque embryonnaire apparaît entouré de tout le réseau sanguin.

Pour réussir ces préparations, on sectionne, transversalement et complètement, l'œuf au niveau du bourrelet ectodermique ; on laisse de côté la portion placentaire. Puis, introduisant la pointe de fins ciseaux dans la cavité ovulaire et opérant sous la loupe, on pratique, dans la direction de l'embryon, quatre ou cinq

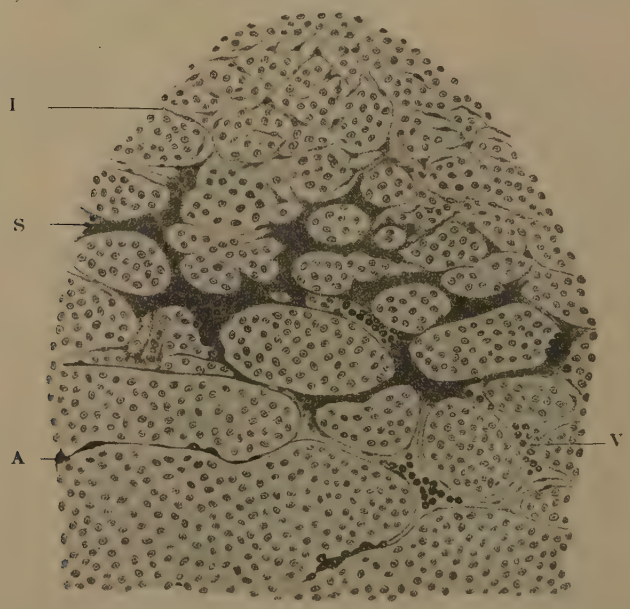


Fig. 310. — Œuf de cobaye du 14e jour. Un des lambeaux de l'aire vasculaire représentée figure 309.

I, portion interne de l'aire vasculaire; — *S*, réseau des cordons sanguins; — *V*, vaisseau formé par la différenciation des ébauches sanguines ; il contient des cellules sanguines primitives; — *A*, pointe d'accroissement du réseau des cordons sanguins. 120 diam.

sections radiées qui permettent d'obtenir une préparation à plat, complète, de l'aire vasculaire en formation. En montant la préparation colorée, on fait en sorte que la face profonde, mésodermique de l'œuf, soit tournée du côté de l'observateur. On aperçoit le disque embryonnaire, et autour de lui, à une certaine distance, formant un anneau à peu près complet, le cercle des cordons mésoblatiques, plus développé du côté caudal que du côté céphalique et dont le réseau trace l'image du réseau vasculaire qui lui succédera.

Les cordons mésoblastiques sont d'abord formés par des cellules fusiformes, étroitement accolées les unes aux autres, mais non fu-

sionnées. La différenciation des cellules sanguines à leurs dépens se fait surtout à la périphérie du réseau, dans sa zone d'extension, loin de l'embryon, par conséquent. Certaines cellules rétractent leurs prolongements, prennent une forme massive en même temps que leur protoplasma prend une affinité très grande pour les couleurs

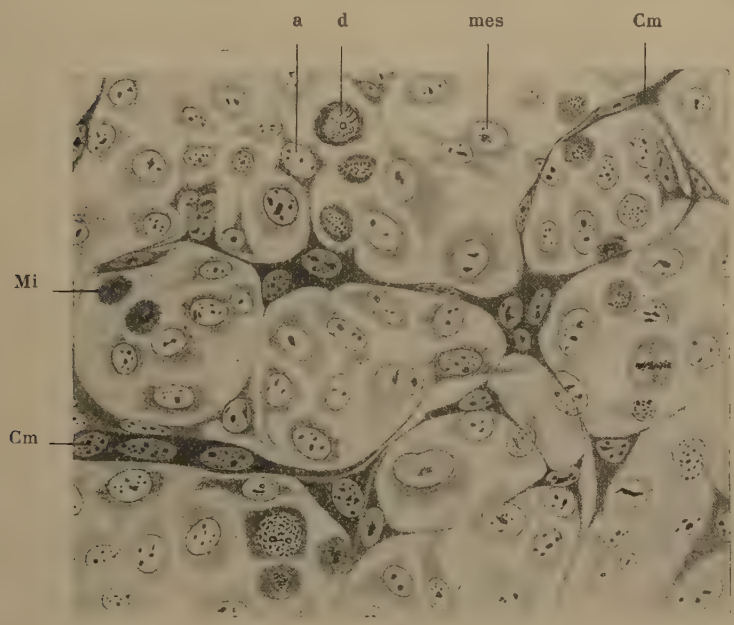


Fig. 311. — Œuf de cobaye du 14e jour. Lambeau vu à plat. Portion interne de l'aire vasculaire (point I de la fig. 310 plus grossi). Différenciation des cordons mésoblastiques (*Cm*) aux dépens du mésoderme extra-embryonnaire, formé d'une seule couche de cellules aplaties, *Mes*; *a*, cellule mésodermique anastomosée avec un cordon; *d*, cellule mésodermique en train de se libérer de ses connexions et se préparant à subir la division; *Mi*, mitose d'une cellule mésodermique. Bichromate-sublimé-formol; éosine, bleu polychrome. 525 diam.

nucléaires. Ces cellules sont les *cellules sanguines primitives* qui ne contiennent pas encore d'hémoglobine. Cette différenciation est surtout intense au niveau des points nodaux du réseau, et là, on voit les cellules les plus internes, les plus centrales, se transformer en cellules sanguines et les cellules les plus externes se transformer en cellules endothéliales et former une paroi vasculaire. Il s'agit là de véritables îlots sanguins. Mais, en certains points du réseau, la différenciation est parfois si intense et si rapide que toute l'épaisseur du cordon semble se résoudre en cellules globuleuses; le cordon cellu-

laire paraît interrompu par de véritables grappes. Dans ce cas, les cellules sanguines sont libres entre le mésoderme et l'endoderme ; la plupart d'entre elles, du reste, ne tardent pas à être englobées par des parois vasculaires.

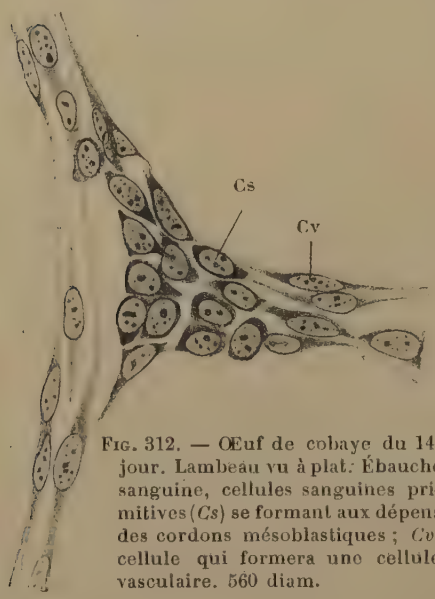


Fig. 312. — Œuf de cobaye du 14e jour. Lambeau vu à plat. Ébauche sanguine, cellules sanguines primitives (*Cs*) se formant aux dépens des cordons mésoblastiques ; *Cv*, cellule qui formera une cellule vasculaire. 560 diam.

Ces renseignements devront être complétés par des coupes. Ces coupes peuvent être pratiquées sur le renflement utérin fixé en totalité ; les sections transversales du renflement donnent des coupes transversales du cylindre ovulaire ; les coupes perpendiculaires, passant par le grand axe du renflement et par l'axe de la corne utérine, couperont l'œuf suivant son grand axe. En général, comme chez le lapin, l'axe de l'embryon, la ligne primitive et la gouttière médullaire par conséquent, sont dans l'axe de la corne utérine ; cependant, cela n'est pas absolu, et pour avoir des coupes exactement orientées, il faut isoler l'œuf. On le sectionne transversalement, on fait l'inclusion à la paraffine du segment embryonnaire ; on moule sous la loupe, en prenant des points de repère précis pour connaître la direction de la ligne primitive.

Ces coupes, en plus des faits que nous avons décrits plus haut, montreront que, comme chez le lapin, il se forme, aux dépens de la couche mésodermique, en plus des ébauches sanguines, des cavités vasculaires primitivement vides de sang. Ces germes vasculaires sont très difficiles à reconnaître sur les préparations à plat de la membrane ovulaire, mais on les voit facilement sur les coupes. Le tube endothélial se forme *in situ*, aux dépens des cellules mésodermiques ; on voit quelquefois une seule cellule s'enrouler ou se vacuoliser pour limiter la cavité vasculaire.

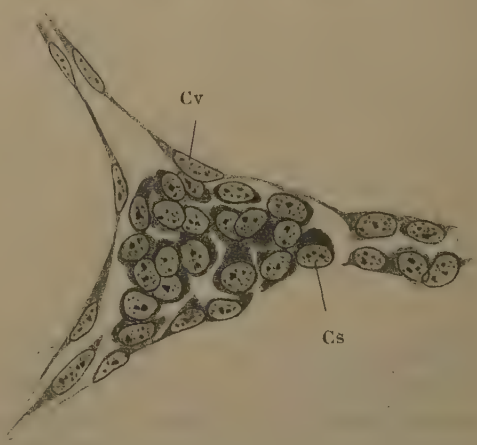


Fig. 313. — Œuf de cobaye du 14e jour. Un des points nodaux du réseau des cordons mésoblastiques. Ebauche sanguine plus avancée. *Cs*, cellule sanguine primitive ; — *Cv*, cellule endothéliale vasculaire. 560 diam.

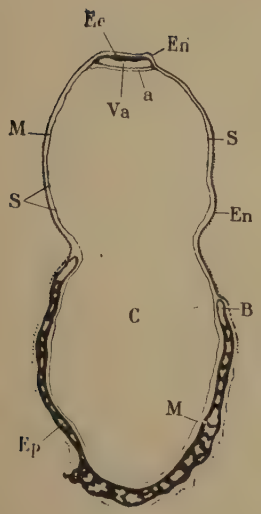


Fig. 314. — Œuf de cobaye du 14e jour. Coupe totale, sectionnant transversalement la ligne primitive. Le pôle embryonnaire de l'œuf est en haut.

Va, vésicule médullo-amniotique; — *Ec*, ectoderme embryonnaire; — *En*, endoderme; — *a*, amnios; — *M*, mésoderme extra-embryonnaire; — *S*, *S*, ébauches sanguines; — *Ep*, ectoplacenta; — *B*, bourrelet ecto-placentaire; — *C*, cavité de l'œuf (cœlome extra-embryonnaire). 15 diam.

Fig. 315. — Œuf de cobaye du 14e jour. Coupe de la paroi de l'œuf pour montrer les rapports des feuillets et des ébauches sanguines.

E, endoderme; — *M*, mésoderme extra-embryonnaire; — *S*, *S*, ébauches sanguines. 100 diam

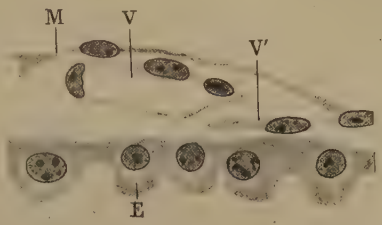


Fig. 316. — Œuf de cobaye du 14e jour. Coupe montrant la portion la plus interne de l'aire vasculaire.

V, *V'*, ébauches vasculaires primitivement vide de sang; — *M*, mésoderme; — *E*, endoderme. 750 diam.

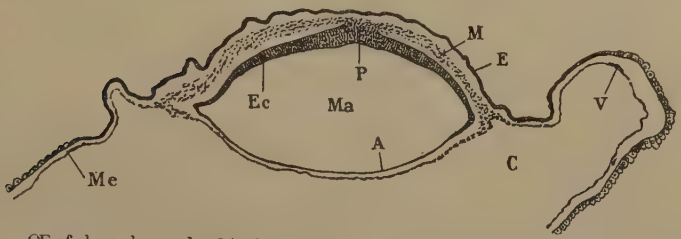


Fig. 317. — Œuf de cobaye du 14e jour. Coupe transversale passant par la ligne primitive. Pôle embryonnaire de l'œuf, pour montrer les rapports des feuillets et de l'aire vasculaire.

P, massif de la ligne primitive; — *E*, endoderme; — *Ec*, ectoderme; — *Ma*, vésicule médullo-amniotique; — *A*, paroi ectodermique de l'amnios revêtue d'une couche de mésoderme; — *M*, mésoderme, se détachant de la ligne primitive; — *Me*, mésoderme extra-embryonnaire doublant profondément la couche unique des cellules endodermiques (feuillet invaginé du sac vitellin); — *C*, cavité de l'œuf (cœlome extra-embryonnaire); — *V*, ébauche vasculaire. 90 diam.

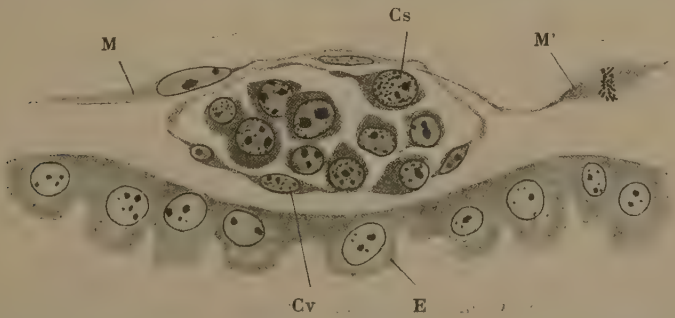


Fig. 318. — Œuf de cobaye du 14e jour. Coupe de la paroi ovulaire intéressant une ébauche sanguine.

E, endoderme (feuillet interne de la vésicule ombilicale); — *M*, *M'*, cellules du feuillet mésodermique dont l'une est en mitose; — *Cs*, cellules sanguines primitives en train de se différencie aux dépens des cellules mésodermiques; — *Cv*, cellule vasculaire. 800 diam.

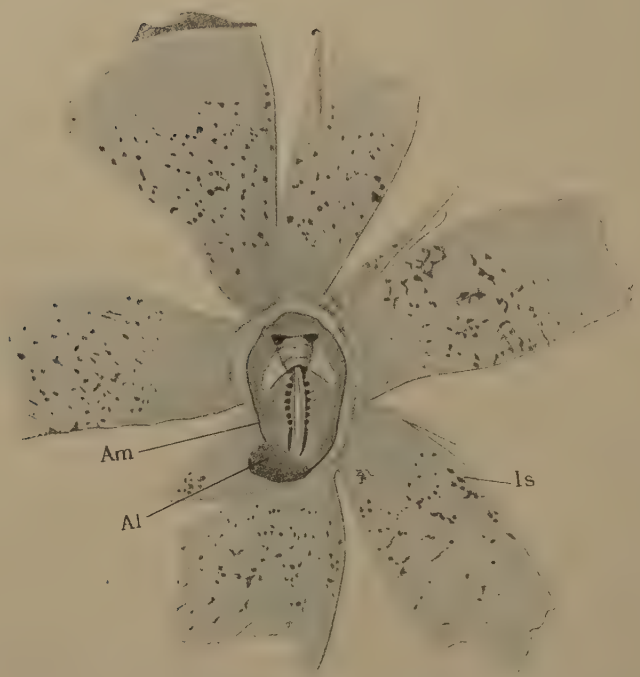


Fig. 319. — Œuf de cobaye du 15e jour. Pôle embryonnaire de l'œuf incisé, étalé, et montrant sa face profonde.

Am, amnios; — *Al*, allantoïde; — *Is*, îlots sanguins formant une large zone annulaire entourant l'embryon. 9 diam.

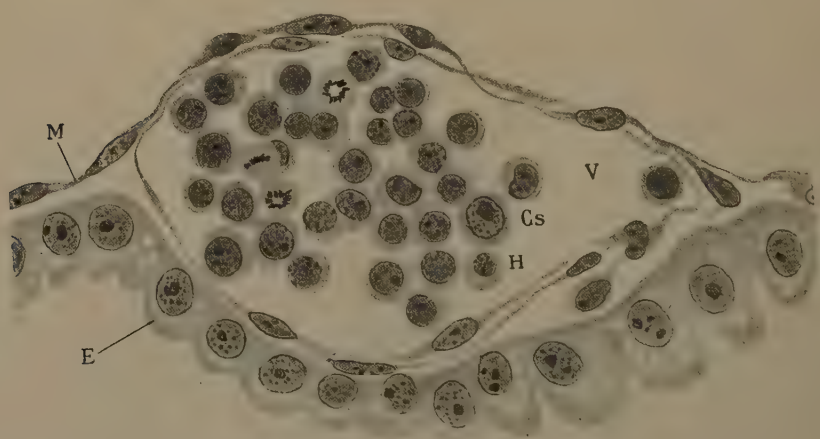


Fig. 320. — Œuf de cobaye du 15e jour. Coupe du disque germinatif représenté fig. 319 et passant par un îlot sanguin. Transformation des cellules sanguines primitives en hématies primordiales.

M, mésoderme; — *E*, endoderme; — *V*, cavité vasculaire; — *CS*, cellule sanguine primitive; — *H*, hématie primordiale. 560 diam.

Au 15e jour, l'œuf est globuleux, l'embryon est déjà bien différencié et les premiers somites sont apparus. L'embryon, en grande partie détaché de ses membranes, proémine dans la cavité de l'œuf (1); sa face abdominale, convexe, montre la gouttière intestinale, ouverte vers l'observateur sur l'œuf que l'on a isolé. A ce stade, l'aire vas-

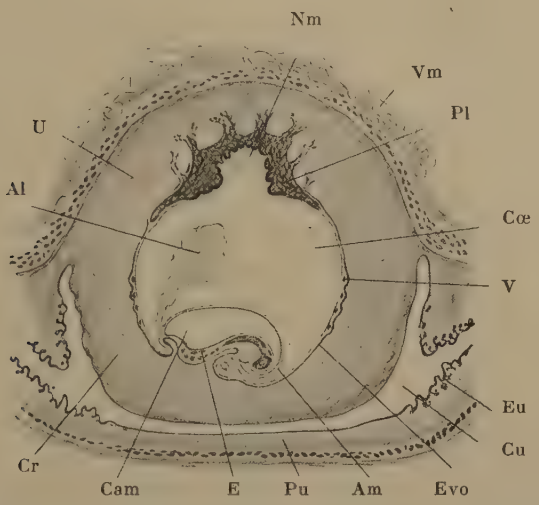


Fig. 321. — Œuf de cobaye de la fin du 15e jour. Coupe du renflement utérin suivant l'axe de la corne utérine pour montrer les rapports de l'aire vasculaire.

Al, allantoïde; — *Am*, amnios; — *E*, embryon sectionné exactement suivant son grand axe; — *Cam*, cavite amniotique; — *Cœ*, cœlome extra-embryonnaire; — *Pl*, placenta; — *Nm*, noyau mésodermique; — *Vm*, vaisseaux du mésomètrium; — *V*, vaisseaux de l'aire vasculaire; — *Evo*, endoderme de la vésicule ombilicale, dont la cavité et la paroi externe ont disparu; — *U*, tissu utérin; — *Cr*, caduque réfléchie; — *Pu*, paroi de la corne utérine; — *Cu*, cavité utérine; — *Eu*, épithélium utérin. 6 diam. D'après Mathias Duval.

culaire est en pleine formation; les groupes de cellules sanguines nombreuses sont contenus dans un réseau vasculaire. Les cellules sanguines primitives sont en train de se transformer en *hématies primordiales* et l'hémoglobine apparaît. Ces phénomènes de différenciation ne sont pas différents de ce que nous avons vu chez le lapin; et à partir de ce moment, on peut suivre ici l'évolution des *hématies primordiales*, puis celle des *hématies secondaires*, telle que nous l'avons étudiée plus haut (2).

(1) Qui est en réalité la cavité du cœlome extra-embryonnaire.
(2) Chez le cobaye, il ne se forme pas de véritable sinus marginal.

ÉBAUCHES SANGUINES DU RAT ET DE LA SOURIS

En raison de leur petitesse, l'œuf du rat et l'œuf de la souris sont des objets moins favorables que l'œuf du cobaye pour l'étude des

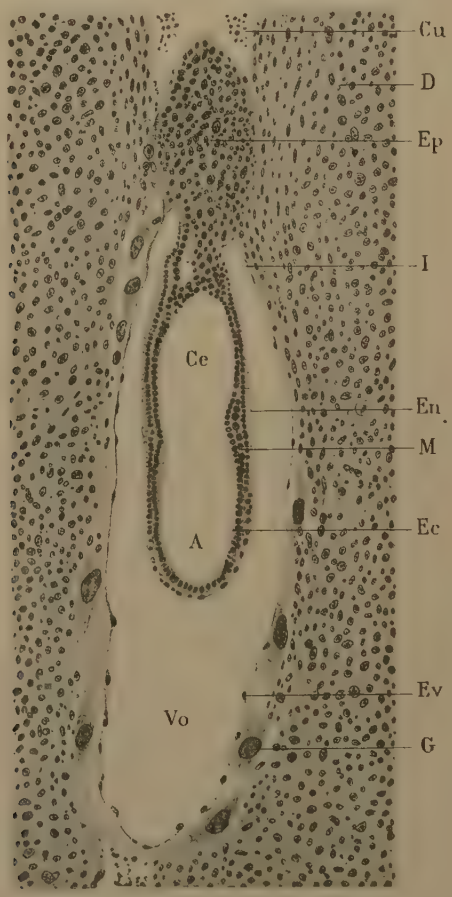


Fig. 322. — Œuf de rat du 9e jour. Coupe du renflement utérin sectionnant l'œuf suivant son grand axe et passant par la ligne primitive. Figure destinée surtout à faire comprendre la disposition invaginée de l'œuf des rongeurs.

Cu, cavité de la corne utérine; — *D*, décidua; — *Ep*, ectoplacenta; — *Vo*, cavité de la vésicule ombilicale; — *I*, point où le feuillet pariétal (*Ev*) de la vésicule ombilicale se continue avec le feuillet endodermique invaginé (*En*); — *M*, épaisissement formé par la ligne primitive et où l'on voit apparaître, entre l'ectoderme embryonnaire (*Ec*) et l'endoderme (*En*), les premières cellules mésodermiques; — *Ce*, cavité ectodermique; — *A*, cavité médullo-amniotique; — *Ev*, feuillet pariétal de la vésicule ombilicale (membrane de Reichert) auquel sont accolées en dedans des cellules endodermiques; — *G*, cellules géantes provenant, pour la plupart, de l'ectoderme de l'œuf. 95 diam

ébauches sanguines. Mais ils donneront aussi des renseignements in-

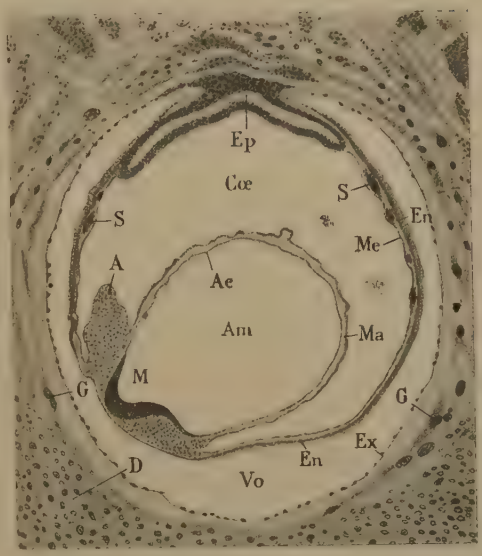


Fig. 323. — Œuf de rat du 10e jour sectionné pour montrer la situation des ébauches sanguines en voie de dissociation, S.

Ep, cavité ectoplacentaire; — *Cœ*, cœlome extra-embryonnaire; — *Me*, mésoderme extra-embryonnaire; — *Vo*, cavité de la vésicule ombilicale; — *Ex*, feuillet externe ou endoderme pariétal de la vésicule ombilicale; — *En*, feuillet interne invaginé, de la vésicule ombilicale; — *G*, cellules géantes provenant de l'ectoderme de l'œuf; — *D*, tissu utérin (décidua capsulaire); — *Am*, cavité amniotique; — *M*, gouttière médullaire; — *Ae*, ectoderme amniotique; — *Ma*, mésoderme amniotique; — *A*, Allantoïde. 45 diam.

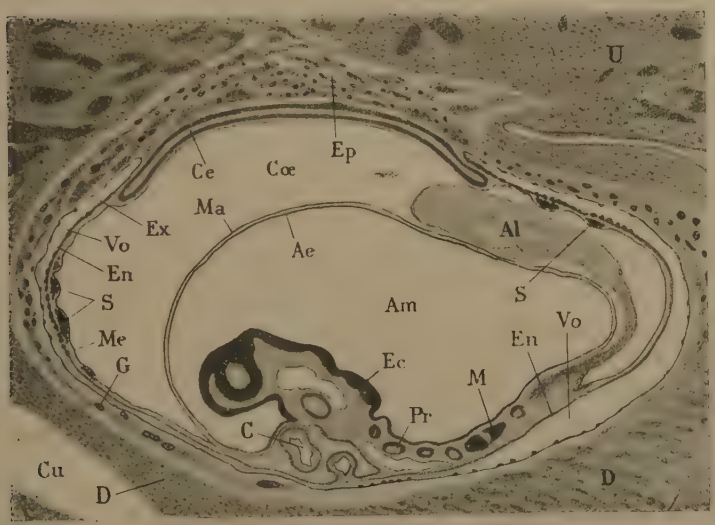


Fig. 324. — Œuf de rat du 11e jour; coupe passant par le plan sagittal de l'embryon.

Ep, ectoplacenta; — *Ce*, cavité ectoplacentaire; — *Cœ*, cœlome extra-embryonnaire; — *Vo*, cavité de la vésicule ombilicale, très effacée par suite de l'invagination de l'œuf; — *Ex*, feuillet externe ou pariétal de la vésicule ombilicale (endoderme pariétal ou distal); — *En*, feuillet interne (endoderme invaginé ou proximal) de la vésicule ombilicale; — *S*, ébauches sanguines dissociées (ilots sanguins); — *Me*, mesoderme extra-embryonnaire; — *G*, cellules géantes d'origine ectodermique; — *D*, tissu utérin (décidua capsulaire); — *Cu*, cavité de la corne utérine; — *Am*, vésicule amniotique; — *Ae*, ectoderme amniotique; — *Ma*, mésoderme tapissant l'amnios; — *Ec*, ectoderme embryonnaire; — *C*, cœur; — *Pr*, protovertèbres; — *M*, tube médullaire sectionné obliquement — *En*, endoderme embryonnaire; — *Al*, allantoïde. 35 diam.

téressants. Chez ces animaux, l'ovulation paraît spontanée ; l'ovulation et l'accouplement se produisent quelques heures après le part ; il est donc facile de recueillir des œufs d'âge déterminé. La durée de la gestation est d'environ 20 jours chez la souris, 21 à 23 jours chez

Fig. 325. — Embryon de souris de 8 millimètres. Sang du cœur. Hématies primordiales, dont trois sont en mitose. 650 diam.

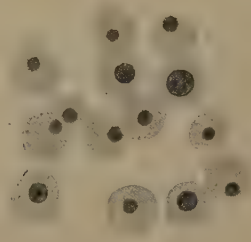


Fig. 326. — Embryon de rat de 10 millimètres. Sang du cœur. Hématies primordiales. Dans la plupart, le noyau est en train de s'atrophier. 550 diam.

le rat blanc (1). Les ébauches sanguines apparaissent environ au 8e jour chez la souris, au 9e jour chez le rat. Elles se forment, comme chez le cobaye, aux dépens du mésoderme extra-embryonnaire, et dans les mêmes conditions. Leur évolution ultérieure est la même (2). Le sac vitellin ne joue que peu de temps un rôle hématopoiétique.

ÉBAUCHES SANGUINES DE L'HOMME

Nous avons décrit en détail la formation et la différenciation des ébauches sanguines du lapin et du cobaye parce que ce sont des objets favorables sur lesquels ces observations peuvent être facilement répétées. Chez l'homme, les stades précoces où apparaissent les premiers îlots sanguins ont été très rarement observés, et le plus souvent dans un état de conservation qui n'a pas permis une étude satisfaisante de ces phénomènes. Toutefois, les faits qui ont été publiés nous per-

(1) Voir pour l'œuf de la souris : Selenka, *Studien über Entwicklungsgeschichte der Thiere*. I, 1883 ; Mathias Duval, *J. de l'Anatomie*, XXVII, 1891 ; Sobotta, *Archiv. f. mikr. Anatomie*, LXXVIII, 1911. Et pour l'œuf du rat : Grosser, *Vergleichende Anatomie der Eihäute und der Placenta. Wien und Leipsig*, 1909; Widakowich, *Zeitschrift f. wiss. Zoologie*. XCIV, 1910 ; G. C. Huber, *J. of. Morphology*, XXVI, 1915.

(2) Au stade de formation des ébauches sanguines, l'œuf du rat et celui de la souris ont une forme cylindrique, comme l'œuf du cobaye, et comme lui, sont contenus dans une épaisse caduque. Les coupes du renflement utérin pratiquées suivant l'axe de la corne utérine et le plan du mésométrium couperont l'œuf suivant son grand axe ; les coupes transversales de la corne utérine auront quelque chance de couper en travers la ligne primitive et la gouttière médullaire ; les coupes tangentielles du renflement, couperont transversalement le cylindre ovulaire.

mettent de penser que les ébauches sanguines apparaissent ici aussi en dehors de l'embryon, dans les parois de la vésicule ombilicale et qu'elles se forment aux dépens du mésoderme extra-embryonnaire. Les *hématies primordiales* ont les mêmes caractères que ceux que nous avons décrits chez le lapin et chez le cobaye et elles se forment de la même façon aux dépens de cellules sans hémoglobine.

Fig. 327. — Œuf humain d'environ six semaines. Coupe d'une villosité choriale. Vaisseau sanguin contenant des hématies primordiales. 250 diam.

Des vaisseaux remplis de cellules sanguines libres existent déjà à la surface de la vésicule ombilicale à un stade où le disque embryonnaire ne montre encore aucune protovertèbre formée et où il présente, dans la ligne axiale, une gouttière primitive et une ligne primitive. Ce stade, qui est visible par exemple dans les œufs humains étudiés par *Frassi* et par *Spée* (1), représente des œufs de la 3e semaine environ et correspond, comme état de développement, à l'œuf de lapin du 8e jour et à l'œuf de cobaye du 14e jour que nous avons étudiés en détail. Comme chez ces animaux, les ébauches sanguines apparaissent donc à un stade très précoce, bien avant la segmentation du corps de l'embryon et au moment où, à l'extrémité céphalique de la ligne primitive commencent à se former une ébauche chordale et une gouttière médullaire. Mais la formation première des ébauches sanguines n'a pas été étudiée. De même, le stade de l'apparition de l'hémoglobine, de la transformation des cellules sanguines primitives en hématies primordiales ne peut être encore déterminé exactement.

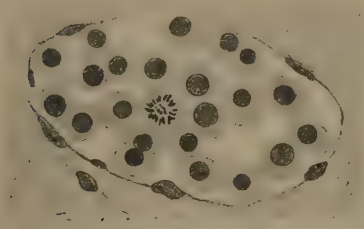


Fig. 328. — Même préparation que figure 323; vaisseau sanguin rempli d'hématies primordiales; l'une d'elles est en mitose. 500 diam.

Dans les œufs humains qui ont été étudiés au stade où les premiers somites sont déjà apparus, les vaisseaux de la vésicule ombilicale contiennent des hématies primordiales. Ce n'est qu'un peu

(1) Frassi, *Archiv. f. mikr. Anatomie*, LXX, 1907 et LXXI, 1908; — Spee, *Archiv. f. Anatomie*, 1896. Voyez aussi : Keibel et Mall, *Handbuch der Entwicklungsgeschichte des Menschen*, I, Leipzig. 1910; — Grosser, *Vergleichende Anatomie und Entwickelungsgeschichte der Eihäute und der Placenta*. Wien et Leipsig, 1909; — Bryce et Teacher, *An. Anzeiger*, XXXII, 1908; Eternod, *Ass. des An.* Genève, 1905. *Revue gen. des sc*, 1913 et XVII *Int. Congres of Med.* London, 1913; — Jordan, *An. Anzeiger*, XXXVII, 1910; — Branca, *J. de l'Anatomie*, XLIX, 1913.

plus tard, et probablement dans le cours de la 4e semaine, qu'apparaissent les hématies secondaires et les hématies définitives sans noyau. Le sac vitellin ne conserve pas longtemps son rôle hémopoiétique et il s'atrophie de bonne heure. A la fin du 2e mois, il est déjà extrêmement réduit et n'est plus représenté que par une petite vésicule qui n'atteint pas la grosseur de la tête de l'embryon. Son rôle, en tant qu'organe hémopoiétique est complètement terminé. Ce rôle appartient alors surtout au foie. La rate est apparue déjà

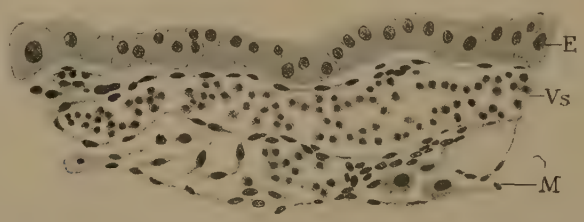


Fig. 329. — Embryon humain de 11 millimètres (âgé environ de six semaines). Coupe de la vésicule ombilicale.

E, endoderme; — *M*, mésoderme; — *Vs*, vaisseau sanguin rempli d'hématies primordiales. D'après Branca.

(5e semaine), mais elle n'a pas une fonction hémopoiétique bien importante. A ce moment, à la fin du 2e mois, dans le sang de l'embryon, les globules rouges nucléés appartiennent aux deux générations d'hématies; les hématies primordiales ont un noyau en pycnose et commencent à disparaître; les hématies définitives sans noyau sont déjà très nombreuses (1).

ÉBAUCHES SANGUINES DES OISEAUX

Chez les Oiseaux, les ébauches sanguines apparaissent, comme chez les Mammifères, à la surface du sac vitellin, loin de l'embryon. L'œuf des Oiseaux, volumineux, extrêmement riche en vitellus, ne subit qu'une segmentation incomplète aboutissant à la formation d'un disque germinatif aplati qui occupe, à l'un des pôles, la surface de l'œuf. Les premières cellules sanguines, incolores, se forment, comme chez les Mammifères, à la surface des réserves nutritives de

(1) Pour le développement ultérieur du sang embryonnaire chez l'homme, voir le ch. xi. Chez les Carnassiers et les Chiroptères, on ne possède aussi sur la formation des premières cellules sanguines, que des données fragmentaires; mais ce que nous en savons est en accord complet avec la description que nous avons faite de ces phénomènes chez le lapin et le cobaye. (Voir Mathias Duval, *J. de l'Anatomie*, 1893, 1894, 1895, 1896 et 1897 et Van der Stricht, *Bull. Ac. roy. de méd. de Belgique*, 29 avril 1899.)

l'œuf, et non dans le corps l'embryon. Ces premières cellules sanguines sont absolument identiques à celles des Mammifères et les hématies primordiales hémoglobiques des Oiseaux sont semblables aussi aux hématies primordiales des Mammifères. L'évolution ultérieure seule diffère ; elle aboutit chez les Oiseaux, à la formation d'une hématie définitive qui est nucléée, ovalaire et discoïde.

La facilité avec laquelle on peut recueillir un abondant matériel d'âge connu a fait depuis longtemps de l'œuf de poule un objet précieux pour toutes les études embryologiques (1). Les œufs, frais, fécondés, de provenance connue, et qu'on a laissé reposer vingt-quatre heures s'ils ont voyagé, sont placés dans un incubateur à 39°, horizontalement, sur de l'ouate. Ils ne doivent être ni lavés ni nettoyés. L'usage, répandu parmi les éleveurs, de retourner les œufs deux fois en 24 heures, à heures fixes, n'est certainement pas indifférent et donne une plus grande proportion de succès. La date et l'heure à laquelle l'œuf a été mis à l'étuve est inscrit au crayon sur la coquille. L'âge de l'embryon est l'intervalle de temps qui sépare le moment où l'œuf a été mis à l'étuve et le moment où il aura été retiré pour l'étude. Cet âge est noté en heures pour les premiers stades, en jours pour les stades avancés. On parle d'embryons du 4e jour, du 5e jour, ce qui correspond à des embryons ayant 72 à 96 heures, 96 à 120 heures. Dans les stades tardifs, on parle quelquefois d'embryons de 15 jours, de 18 jours ce qui correspond à des embryons du 16e jour et du 19e jour. L'âge égal des embryons n'est pas l'indice d'un développement identique : il peut y avoir à ce sujet de notables différences. L'incubation naturelle par une poule donne une bonne proportion de succès, mais elle ne peut s'appliquer qu'à un petit nombre d'œufs ; de plus, elle n'est pas pratique quand on veut des stades différents et rapprochés, la poule cessant de couver si le nombre des œufs qu'on lui a confiés diminue trop rapidement. L'incubation par une poule rendra des services pour les œufs de canard ou d'oie, dont l'incubation artificielle est plus difficile à réussir. Les préceptes sont ici les mêmes que pour les œufs de poule, mais l'humidité de l'atmosphère de l'étuve, le retournement journalier des œufs sont des précautions plus indispensables encore. On sait que la durée de l'incubation, qui est de 21 jours chez la poule est de 29 à 30 jours chez le canard et de 30 jours chez l'oie.

L'apparition des premières ébauches sanguines étant très précoce, on recueillera les embryons de poulet dès la deuxième moitié du 1er jour, à partir de la 15e heure. L'œuf incubé est fixé avec un peu de cire à modeler sur le fond plat d'une cuvette à dissection, le gros bout placé à la gauche de l'observateur. Dans ces conditions et par suite de la manière dont le jaune se trouve suspendu par les chalazes, par suite aussi des densités différentes des diverses portions du vitellus, l'embryon, qui se forme à la surface du vitellus, au niveau de la cicatricule, se trouvera toujours placé en haut, vers l'observateur, son axe perpendiculaire au grand axe de l'œuf, l'extrémité céphalique dirigée en avant. Avec la pointe d'une pince à dissection tenue les mors fermés, on casse avec précaution la coquille au centre de l'œuf sur l'étendue d'une pièce de deux francs ; on enlève avec soin les fragments ainsi que la membrane coquillière. Le vitellus apparaît ; au centre

(1) Voir Mathias Duval, *Atlas d'embryologie*, Paris, 1889.

est la tache claire correspondant à la cicatricule transformée maintenant en disque germinatif ou blastoderme. Celui-ci forme alors une mince lamelle adhérente au tissu sous-jacent. Pour recueillir cette membrane, voici comment on procédera. Avec une pipette, on arrose d'abord doucement la surface du disque germinatif avec un mélange bichromate-sublimé-formol. Lorsqu'il a pris une certaine consistance, on agrandit l'ouverture de la coquille; puis, plongeant franchement la pointe de fins ciseaux dans le jaune, en dehors du disque, on découpe une surface circulaire égale à environ une pièce de 1 franc. Une spatule métallique plate, mince et suffisamment large est passée alors sous le disque germinatif qu'on transporte dans de l'eau salée à 8 p. 1.000. En l'agitant doucement, on le débarrasse du vitellus, puis on le reporte avec la spatule dans un cristallisoir rempli de fixateur neuf où on le laisse le temps nécessaire à la fixation complète (1). Il est ensuite transporté dans l'eau distillée, ou examiné tel quel, puis coloré et monté à plat ou débité en coupes après inclusion dans la paraffine ou la celloïdine.

Vers le 4e ou le 5e jour, l'embryon étant déjà gros, et l'aire vasculaire très étendue sur le vitellus, il faut procéder autrement. L'œuf étant largement ouvert, on vide tout son contenu dans un cristallisoir préalablement rempli d'eau salée à 8 p. 1.000 chauffée à 38°. On distingue nettement l'embryon revêtu de l'amnios transparent, la vésicule ombilicale enveloppant le vitellus et dans la paroi de laquelle rampent les vaisseaux vitellins, la vésicule allantoïdienne encore peu développée. Avec de fins ciseaux, on sépare l'embryon avec l'amnios, l'allantoïde et la vésicule ombilicale. Avec une spatule en corne, on transporte la vésicule ombilicale dans un autre vase, on l'ouvre du côté de son pôle distal (ombilic ombilical), on l'agite doucement dans l'eau salée pour la débarrasser du vitellus; on la lave ainsi dans plusieurs vases; puis, toujours dans l'eau salée, on l'étend sur la face convexe d'un verre de montre, et on porte le tout sur le fond d'une soucoupe vide; on verse alors goutte à goutte le fixateur; lorsque la membrane a subi un début de fixation, on la transporte dans un petit cristallisoir contenant le fixateur (2). Le traitement ultérieur est le même que précédemment. Quand la membrane est trop grande, on la découpe pour la colorer et la monter à plat, face interne en haut; il vaut mieux recueillir les portions situées entre les gros vaisseaux; on fera aussi des coupes de la paroi du sac vitellin. Quant à l'embryon, il est fixé en entier avec l'amnios et l'allantoïde (3).

Apparition des ébauches sanguines. — Si l'on examine avec une forte loupe ou au microscope avec un objectif très faible un disque germinatif de la 18e ou de la 20e heure, fixé, et conservé dans l'eau,

(1) Pour les jeunes disques germinatifs de 15 à 40 heures, un séjour d'une heure et demi à deux heures suffira en général. On peut, avant d'arroser *in situ* la surface du germe avec le liquide fixateur, l'arroser un instant avec l'eau salée pour éloigner complètement l'albumine. A côté des mélanges bichromate-sublimé-formol, on utilisera aussi avec profit les mélanges de Dominici et les mélanges chromo-osmiques.

(2) Avec les mélanges bichromate-sublimé-formol, on fixe la paroi du sac vitellin pendant deux heures environ.

(3) Avec les mélanges bichromate-sublimé-formol, on fixe environ 4 heures. A partir du 6e jour environ, l'embryon, avant d'être immergé dans le fixateur, doit être débarrassé, dans l'eau salée, de son amnios et de l'allantoïde. Pour faciliter la pénétration du fixateur on fend la paroi abdominale et la tête. Après le 12e ou le 15e jour, l'embryon est traité comme un autre objet : on sépare, avant la fixation, les portions que l'on désire étudier.

on constate qu'il présente trois zones concentriques différentes d'aspect : au centre l'aire embryonnaire entourée de l'aire transparente ou pellucide ; plus en dehors, l'aire opaque ou vitelline qui se continue avec la surface du jaune. L'aire embryonnaire montre déjà la ligne primitive qui apparaît comme une ligne plus foncée, de 2 millimètres de long environ, souvent formée de deux traits parallèles, séparés par une ligne plus claire, la gouttière primitive. Sur des œufs un peu plus âgés (20 à 24 heures), l'extrémité antérieure, céphalique de la ligne primitive montre un très court prolongement opaque : c'est le début du prolongement céphalique ou ébauche chordale. Il est entouré lui-même d'un halo arrondi. C'est à ce stade qu'apparaissent les premières ébauches sanguines. Pour les voir, il faut colorer le disque germinatif et le monter à plat dans le baume.

Fig. 330. — Embryon de poulet de la 20e heure. Disque germinatif fixé et examiné à plat sans coloration.

E, écusson embryonnaire ; — *P*, ligne primitive avec la gouttière primitive ; — *C*, extrémité céphalique de la ligne primitive ; — *T*, aire transparente ou pellucide ; — *V*, aire opaque ou vitelline. 10 diam.

Les premières ébauches sanguines apparaissent comme de petites taches foncées, plus vivement colorées, séparées et groupées à l'extrémité postérieure ou caudale de la ligne primitive. Lorsque le prolongement céphalique a déjà atteint une longueur appréciable, égale par exemple au tiers ou à la moitié de la ligne primitive, ces îlots sanguins sont nettement visibles et forment un court demi-cercle qui embrasse l'extrémité postérieure de la ligne primitive, à la limite de l'aire transparente et de l'aire opaque. Dans les stades suivants, pendant la formation de la gouttière médullaire et des protovertèbres, les îlots sanguins, toujours séparés, s'avancent de chaque côté, vers l'extrémité céphalique de l'embryon, formant un fer à cheval ouvert en avant et qui occupe la zone périphérique de l'aire opaque. En même temps, ils s'avancent en dedans, occupant une surface de plus en plus large. Au moment

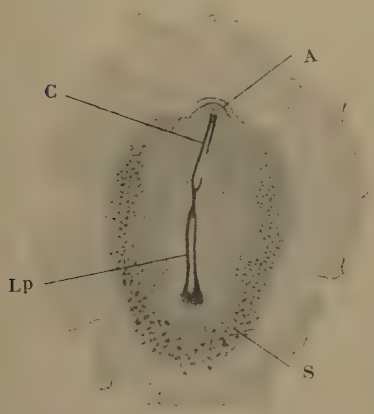


Fig. 331. — Embryon de poulet de la 24e heure. Disque germinatif fixé, coloré et monté dans le baume.

Lp, ligne primitive avec la gouttière primitive ; — *C*, prolongement céphalique avec l'ébauche de la gouttière médullaire ; — *A*, repli amniotique ; — *S*, ébauches sanguines. 10 diam.

où l'embryon possède déjà quelques segments, l'ensemble des ébauches sanguines anastomosées, forme un réseau dont les points nodaux représentent les îlots sanguins.

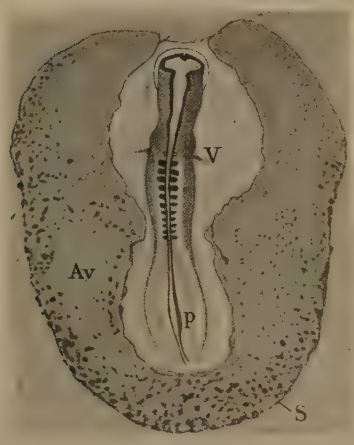


Fig. 332. — Canard. Disque germinatif de 48 heures. L'embryon est vu par sa face dorsale.

V, veines vitellines; — *P*, reste de la ligne primitive; — *Av*, aire vasculaire montrant de nombreux îlots sanguins, confluents à la périphérie où se forme le sinus marginal *S*. 9 diam.

L'examen de ces préparations à un plus fort grossissement montre que ces îlots sanguins sont formés de groupes cellulaires absolument semblables à ceux que nous avons étudiés chez les Mammifères et constitués par des *cellules sanguines primitives* sans hémoglobine, à protoplasma basophile, groupes cellulaires à la limite desquels apparaît bientôt une paroi endothéliale. Mais ici, la présence du vitellus gêne beaucoup l'observation, et pour avoir une idée exacte de la structure et des relations des îlots sanguins, il faut les examiner sur des coupes.

Rapport des ébauches sanguines avec les feuillets germinatifs. — Pour observer, sur des coupes, la première apparition des ébauches sanguines et leurs relations avec les feuillets, il faut prendre des disques germinatifs de la 21e à la 24e heure, possédant une ligne

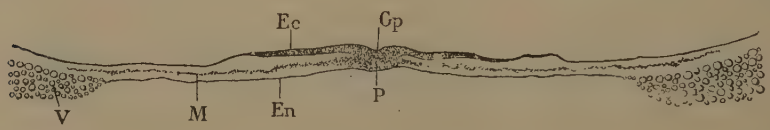


Fig. 333. — Embryon de poulet de la 20e heure. Coupe totale transversale du disque germinatif passant par la ligne primitive.

P, massif de la ligne primitive, d'où se détachent les trois feuillets primordiaux; — *Ec*, ectoderme; — *En*, endoderme; — *M*, mésoderme; — *V*, massif vitellin; — *Gp*, gouttière primitive. 40 diam.

primitive et un prolongement céphalique. Sur une coupe transversale intéressant la ligne primitive, on voit partir, de chaque côté du massif de la ligne primitive, le feuillet mésodermique qui, s'insinuant entre l'ectoderme et l'endoderme, s'avance jusqu'au niveau de l'aire vitelline. Il apparaît formé d'éléments de forme irrégulière, lâchement unis. A une petite distance de son bord libre,

il présente des épaississements qui correspondent aux taches opaques qu'on voyait sur les disques germinatifs examinés à plat et qui sont les premières ébauches sanguines. Ces ébauches sont constituées par des éléments massifs tassés les uns contre les autres, et dont les limites sont souvent indistinctes. Le noyau, arrondi, est nucléolé et

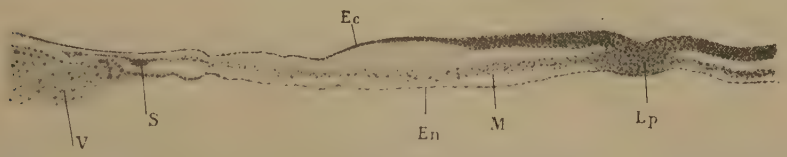


Fig. 334. — Embryon de poulet de la 21e heure. Coupe transversale du disque germinatif dont la moitié gauche est seule représentée.

Lp, massif de la ligne primitive d'où partent les trois feuillets ; — *Ec*, ectoderme; — *En*, endoderme; — *M*, mésoderme; — *V*, massif vitellin; — *S*, ébauche sanguine. 80 diam.

le protoplasma prend les couleurs basiques. Les ébauches ont une forme lenticulaire ; les plus épaisses dépriment la surface du vitellus.

L'apparition des premières ébauches sanguines à la périphérie du disque germinatif, en dehors de la zone qui formera l'embryon, avait frappé les anciens observateurs. C'est sur ce fait que *His* avait établi sa théorie du parablaste qui attribuait la formation du sang et des

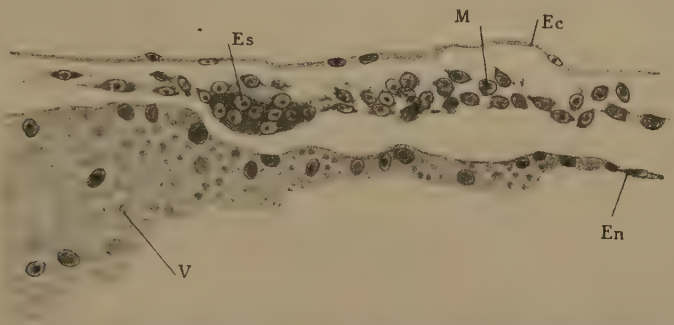


Fig. 335. — Portion gauche plus grossie de la figure précédente pour montrer les rapports de l'ébauche sanguine (*Es*) avec les feuillets.

M, mésoderme, dont l'ébauche sanguine représente un épaississement; — *Ec*, ectoderme; — *En* endoderme ; — *V*, massif vitellin. 350 diam.

vaisseaux à un germe spécial, extra-embryonnaire, non fécondé, le « parablaste », ne dérivant pas de la segmentation des blastomères, provenant directement du vitellus, et pénétrant secondairement dans le corps de l'embryon. Cette théorie a été complètement rejetée ; on sait aujourd'hui que l'ensemble des feuillets du blastoderme qui s'étalent à la surface du vitellus proviennent du germe segmenté ; mais

seules, les portions centrales forment le corps de l'embryon (1). Chez le poulet, comme chez les mammifères que nous avons étudiés, le mésoderme ou mésoblaste provient du massif de la ligne primitive dont il se détache de chaque côté, bourgeonnant ensuite excentriquement et s'insinuant contre les deux feuillets primitifs. Le mésoderme extra-embryonnaire n'est ainsi que l'extension du mésoderme axial. Les rapports que le feuillet moyen affecte avec l'endoderme sont secondaires. Quelques auteurs admettent encore que le mésoblaste, dans son extension périphérique, emprunte à l'endoderme un certain nombre d'éléments ; il s'accroîtrait ainsi en partie par délamination du feuillet interne. Les ébauches sanguines seraient bien mésoblastiques, mais les ébauches périphériques et antérieures, celles qui se trouvent dans la zone d'extension du mésoblaste périphérique, emprunteraient, comme lui, à l'endoderme vitellin sous-jacent, un certain nombre de cellules (2).

L'origine mésoblastique des ébauches sanguines est assez facile à observer chez le poulet ; et chez le canard il en est de même (3). Quant aux cellules que l'endoderme paraît donner au mésoblaste dans sa zone d'extension, elles sont peut-être destinées à disparaître (4) ; ce sont là, en tout cas, des éléments accessoires.

Au moment où les ébauches sanguines apparaissent, le feuillet moyen est encore unique ; sa délamination et la formation du cœlome extra-embryonnaire sont secondaires. Les auteurs qui ont décrit la formation première des îlots aux dépens de la splanchnopleure ont donc décrit des stades très avancés. Au moment où elles apparaissent, les ébauches sanguines ne sont qu'une portion épaissie d'un mésoblaste non dilaminé avec lequel elles se continuent directement de chaque côté. C'est après seulement qu'on voit apparaître au-dessus d'elles une couche de cellules mésoblastiques lâchement unies qui rétablissent au-dessus de l'ébauche sanguine la continuité du feuillet moyen. Le stade où l'on voit le mésoblaste passer au-dessus de l'îlot sanguin est donc un stade secondaire qui coïncide ordinairement avec la différenciation des cellules endothéliales.

(1) On retrouve encore des traces de la théorie de *His* dans des travaux récents. Ainsi, *S. Minot* considère l'ensemble des ébauches sanguines qui apparaissent à la surface du vitellus comme une ébauche spéciale, *l'angioblaste*, qui primitivement, est indépendante du mésoderme, et provient, par fissuration, de l'endoderme vitellin, directement, chez tous les Vertébrés. (S. Minot, *Entwickelung des Blutes*, in *Handbuch der Entwickelungsgeschichte des Menschen* de Keibel et Mall.) Cette manière de voir ne peut être conservée.

(2) Rückert, in *Hertwig's der Handbuch vergl. u. exp. Entwickelungslehre der Wirbeltiere*, I, 1906.

(3) Weber, *C. R. de l'Ass. des Anatomistes*, Lille, 1907.

(4) Dantschakoff, *An. Hefte*, XXXVII, 1908.

Différenciation des ébauches sanguines. Cellules sanguines primitives et cellules endothéliales. — La différenciation des îlots sanguins commence chez des embryons possédant déjà quelques protovertèbres, vers la 25e-30e heure de l'incubation. Du reste, en examinant les coupes transversales successives d'un seul embryon, vers la 30e heure, on trouvera toujours des îlots sanguins à tous les stades de la différenciation ; celle-ci est d'autant moins avancée qu'on se rapproche de l'extrémité céphalique de l'embryon.

Les cellules superficielles de l'îlot sanguin s'aplatissent et forment la paroi endothéliale du vaisseau ; les cellules centrales deviennent

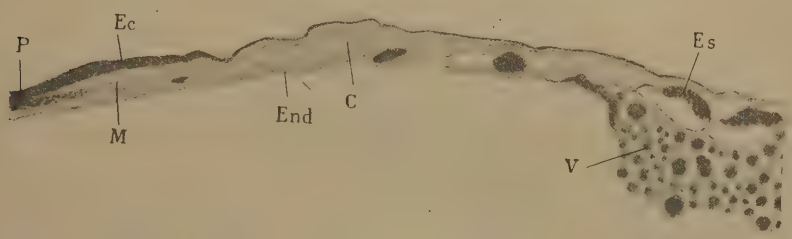


Fig. 336. — Embryon de poulet possédant 12 paires de somites. Coupe du disque germinatif dans la région de la ligne primitive. Dissociation des ébauches sanguines. La figure représente seulement la partie droite de la coupe.

P, massif de la ligne primitive ; — *Ec*, ectoderme ; — *End*, endoderme ; — *M*, mésoderme ; — *Es*, ébauche sanguine en voie de dissociation ; les cellules sanguines occupent la voûte de la cavité vasculaire dont la partie inférieure est remplie par du plasma ; — *V*, massif vitellin ; — *C*, cœlome extra-embryonnaire 80 diam.

les *cellules sanguines primitives*. Dans les gros îlots, la paroi endothéliale néoformée est souvent discontinue, d'où la confluence d'îlots contigus. Cette confluence peut aussi provenir de la disparition secondaire de la cloison résultant de l'adossement des parois de deux îlots contigus.

Les cellules sanguines primitives ont un protoplasma basophile qui peut contenir, au début, quelques grains vitellins ; leur noyau est gros, ovalaire ; il renferme un gros nucléole. Ces cellules sont massives, irrégulièrement arrondies et pressées les unes contre les autres.

C'est à ce stade que commence à apparaître le cœlome. Il est dû à la délamination du mésoblaste en deux feuillets ; mais sa formation est discontinue. Il résulte de la confluence secondaire de petites cavités séparées qui apparaissent progressivement de dehors en dedans ; c'est une marche centripète analogue qui suit la formation de la lumière vasculaire dans les ébauches sanguines.

La formation du cœlome, dans les portions périphériques du disque germinatif est intimement liée à la transformation des îlots sanguins

en cavités vasculaires, la paroi supérieure de l'ébauche contribuant à former la paroi du cœlome. La somatopleure se différencie la première ; la splanchnopleure se forme ensuite et elle est d'abord unie intimement à la paroi vasculaire. Vers le stade de 18 protovertèbres, le cœlome extra-embryonnaire forme une cavité à peu près unique, interrompue seulement en quelques points, et s'étendant sur toute la largeur de l'aire vasculaire (1). Les ébauches sanguines forment alors un réseau de tubes endothéliaux anastomosés. D'abord séparé de l'embryon, ce

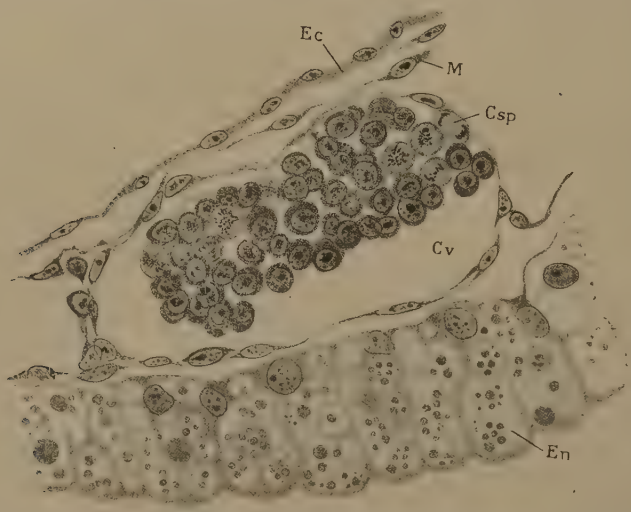


Fig. 337. — Embryon de poulet possédant 12 paires de somites. Coupe du disque germinatif en arrière de la ligne primitive. Ebauche sanguine en voie de dissociation (îlot sanguin).

Ec, ectoderme; — *M*, mésoderme; — *En*, endoderme; — *Cv*, cavité vasculaire ; — *Csp*, cellules sanguines primitives, dont un grand nombre montrent des figures de division. 650 diam.

réseau se relie à lui secondairement par l'intermédiaire d'ébauches vasculaires primitivement vides de sang, qui se forment directement aux dépens du mésoderme (2) ; le cœur se met à battre et la circulation s'établit.

La désagrégation des cellules sanguines coïncide avec ces phénomènes. Cette désagrégation est due à l'apparition du plasma sécrété

(1) Rückert, *l. c.* Par suite de ces rapports intimes entre les îlots sanguins et le cœlome, il arrive que des cellules sanguines, au moment de la dissociation de l'ébauche peuvent tomber dans la cavité générale, comme l'a montré Weber chez le canard (*S. de Biologie*, 13 juillet 1907) ; ces cellules sont destinées à disparaître.

(2) Weber (*S. de Biologie*, 22 avril 1907) a montré, chez le canard, l'existence de formes de transition entre les ébauches vasculaires et les îlots sanguins. Dans certaines de ces ébauches, les cellules centrales dégénèrent tandis que les cellules périphériques deviennent endothéliales.

par l'endoderme et à l'impulsion cardiaque (1). Le plasma apparaît d'abord dans la portion inférieure, profonde, du tube vasculaire ; les cellules sanguines accolées paraissent suspendues à la voûte du tube endothélial (2). Elles se détachent ensuite les unes des autres et la circulation les entraîne peu à peu dans les parties internes de l'aire vasculaire, puis dans le cœur. A ce moment, le sinus marginal (3) et les deux veines vitellines sont apparus (4). Les artères vitellines se forment ensuite (5). La circulation est complète, et les cellules sanguines sont entraînées peu à peu dans tous les vaisseaux.

Évolution des cellules sanguines. Apparition de l'hémoglobine. Hématies primordiales. Hématies définitives. — Les cellules sanguines primitives, au moment où elles sont dissociées et où elles arrivent dans la portion la plus interne de l'aire vasculaire n'ont pas encore d'hémoglobine. A ce moment, il est facile de les observer, non seulement sur des coupes, mais sur des fragments de l'aire transparente montés à plat dans le baume après coloration. Elles sont absolument semblables aux *cellules sanguines primitives* des Mammifères. Dans le cours ou à la fin du 2e jour, chez des embryons de 18 à 20 protovertèbres, à un moment où la circulation vitelline vient de s'établir, l'hémoglobine apparaît. Ces cellules sanguines primitives se transforment graduellement en jeunes globules rouges arrondis : *les hématies primordiales*. Celles-ci sont semblables à celles des

(1) C'est un phénomène passif. Dantschakoff y voit un phénomène actif dû à l'amiboïsme des cellules sanguines ; mais cette interprétation est peu probable.

(2) Rückert attribue cette apparence au fait que la différenciation du tube endothélial est gênée et retardée dans ses portions supérieures par la différenciation, du cœlome ; cette interprétation est très admissible ; mais l'accumulation du plasma, sécrété par l'endoderme vitellin doit jouer aussi un rôle important.

(3) D'après les recherches de Rückert, le sinus marginal est une formation autonome ; le sinus est formé par des germes vasculaires primitivement vides de sang, analogues à ceux de l'aire pellucide. Ce point demande confirmation ; chez le lapin, le sinus marginal se forme au point même où apparaissent les ébauches sanguines les plus extérieures et non en dehors d'elles.

(4) Les deux veines vitellines se différencient aux dépens des germes vasculaires de l'aire pellucide ; leur portion centrale est formée par des cellules vasculaires mésodermiques situées juste en dehors des ébauches cardiaques. Les deux veines vitellines une fois formées, partent de la portion antérieure du sinus marginal, s'infléchissent brusquement et se dirigent vers le cœur, de chaque côté du segment céphalique du blastoderme qui reste libre de vaisseaux. Plus tard, les deux veines vitellines s'unissent sur la ligne médiane et la veine droite subsiste seule.

(5) Elles se forment aux dépens du réseau vitellin primitif. D'après les observations de His, de Vialleton, de Rückert, ces artères vitellines définitives seraient précédées de tractus artériels plus nombreux venus de l'aorte, ébauches transversales constituées seulement par des traînées cellulaires sans lumière qui rappellent les artères vitellines transversales multiples qu'on trouve chez les Reptiles et chez les Sélaciens, mais qui, chez le poulet, restent rudimentaires et se fusionnent de bonne heure.

Mammifères : le corps cellulaire est sphérique. Le noyau, arrondi, diminue un peu de volume ; la chromatine, d'abord rassemblée en un nucléole ou en plusieurs masses, se dissémine et forme un réseau plus régulier. Le protoplasma, après fixation par les bons fixateurs de l'hémoglobine et les doubles colorations éosine-bleu, prend une teinte violacée, mélange de la teinte cytoplasmique (bleue) et de la teinte hémoglobique (rose ou orangée). Dans le protoplasma, les méthodes

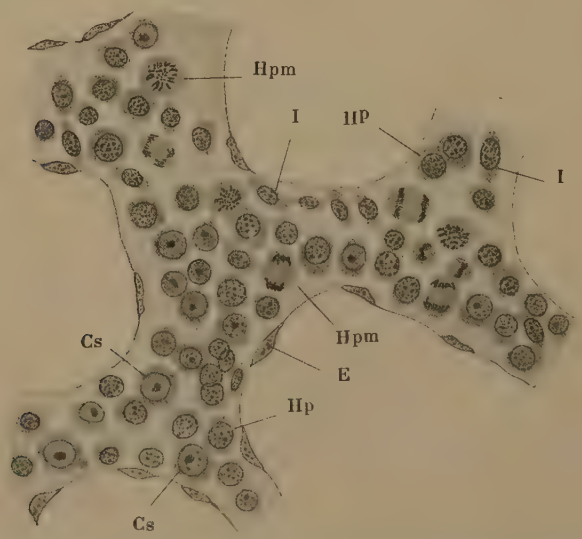


Fig. 338. — Embryon de poulet du 6e jour. Aire vasculaire examinée à plat. Foyer de multiplication et de différenciation de cellules sanguines.

Cs, cellules sanguines primitives; — *Hp*, hématies primordiales; — *Hpm*, hématies primordiales en voie de division; — *I*, éléments fusiformes représentant un stade intermédiaire de la transformation des hématies primordiales en hématies elliptiques, définitives; — *E*, noyau d'une cellule endothéliale vasculaire. 750 diam.

appropriées permettent encore de mettre en évidence des mitochondries (1).

Comme les cellules sanguines primitives, ces hématies primordiales se multiplient activement par mitose. Graduellement, l'hémoglobine s'accroît, ce qui se traduit par une affinité progressive pour les couleurs acides, pour l'éosine d'abord, pour l'orange ensuite (2). Vers le 4e ou le 5e jour, on en voit un grand nombre dont le pro-

(1) Meves, *Archiv. f. mikr. Anatomie*, LXXII, 1908.

(2) On comprend par suite qu'il y ait à ce point de vue de nombreux stades intermédiaires ; mais ils sont insensibles et il n'y a pas lieu de les distinguer : dès que l'hémoglobine commence à apparaître, la cellule sanguine primitive est devenue une hématie primordiale (érythroblaste).

toplasma est franchement hémoglobique. Le noyau, plus petit, possède un réseau chromatique régulier sans nucléole.

Fig. 339. — Embryon de poulet âgé d'environ 27 heures et possédant 8 paires de protovertèbres. Cellules sanguines primitives provenant de la dissociation d'une ébauche sanguine. Mitochondries. D'après Meves.

Le corps cellulaire, d'abord sphérique, s'aplatit ensuite et devient lenticulaire, de sorte que ces cellules, de profil, apparaissent fusiformes. Vers le 4e ou le 5e jour, les hématies primordiales tendent à prendre la forme elliptique en se transformant en *hématies définitives* (1). Un certain nombre d'hématies primitives présentent, à ce moment, des phénomènes de dégénérescence de leur noyau ; ces cellules ne tardent pas à disparaître.

Pendant cette évolution, les cellules sanguines primitives continuent à se multiplier avec activité, surtout dans les points du réseau vitellin où la circulation est moins active. Jusqu'à la fin de l'incubation, on les voit accumulées en grand nombre dans les capillaires du sac vitellin.

Fig. 340. — Embryon de poulet du 3e jour. Hématie primordiale ayant déjà subi un commencement d'évolution et vue de profil. Flemming, hématoxyline au fer. Mitochondries. D'après Meves.

Préhémoglobine du vitellus. Hématogène. — On a cherché à préciser le stade d'apparition de l'hémoglobine dans les hématies primordiales de l'embryon. A ce sujet, l'observation micro-spectroscopique de jeunes disques germinatifs, isolés à l'état vivant dans l'eau salée, ne donne pas de renseignements plus précis que l'analyse histologique et ne montre pas l'apparition du spectre de l'hémoglobine avant la 40e ou la 50e heure (2).

On a cherché aussi à savoir par des analyses chimiques sous quelle forme l'hémoglobine ou ses constituants, étaient donnés aux cellules sanguines par le vitellus. L'œuf de poule se prête à ces recherches à cause de l'abondance de son vitellus. Or les analyses montrent que le vitellus contient du fer (3). Ce fer est décelable aussi

(1) Au fur et à mesure des multiplications des cellules sanguines primitives, les hématies formées diminuent un peu de volume, sans qu'on puisse voir là deux générations successives de cellules sanguines, comparables à celles des mammifères.

(2) Ce résultat coïncide avec celui de l'analyse morphologique. Les réactions microchimiques du fer ne peuvent servir à cette recherche ; les cellules sanguines embryonnaires ne les donnent pas, pas plus du reste que les hématies définitives.

(3) Bunge, *Zeitschrift f. phys. Chemie*, IX, 1885 ; — Smiechowski, *An. Hefte*, 1893.

par les réactions micro-chimiques (1) bien qu'avec une certaine difficulté. Il est ainsi à l'état de composé organique moins stable que l'hémoglobine. Il est uni à une substance phosphorée et constitue avec elle *l'hématogène* de *Bunge*. Cette substance, qui forme le résidu de la digestion du vitellus par la pepsine chlorhydrique et qui renferme un peu de fer, n'est pas une nucléine, comme l'avait d'abord admis *Bunge*, mais un corps mal déterminé, dû à l'association d'un complexe protéique avec un noyau ferrugineux, une sorte de *préhémoglobine* (2) ; le lait, les feuilles vertes contiennent des combinaisons analogues.

Apparition des premiers leucocytes. — Pendant que se poursuit l'évolution cellulaire qui aboutit à la formation des hématies définitives, les cellules sanguines primitives continuent à se multiplier avec activité par mitose, et à donner des cellules semblables à elles ou plus petites. Ces éléments, très semblables aux cellules lymphoïdes germinales que nous étudierons plus tard dans le tissu conjonctif embryonnaire et dans les organes hémopoiétiques, sont cependant ici destinés à se transformer presque tous en hématies ; un petit nombre seulement sont des cellules mères de lymphocytes. Dans les premiers stades, le sang du jeune embryon ne contient pas encore de véritables leucocytes. Mais, dès la fin du 2e jour, dans le tissu intermédiaire aux capil-

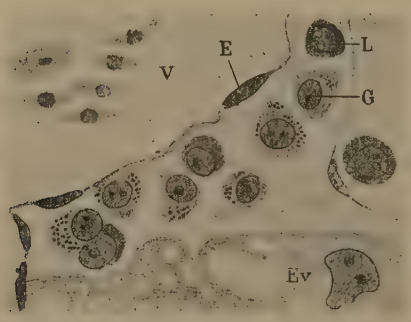


Fig. 341. — Embryon de poulet du 11e jour. Coupe de la paroi du sac vitellin. Formation de granulocytes (*G*) aux dépens de cellules lymphoïdes indifférentes (*L*) dans le tissu conjonctif intermédiaire aux vaisseaux sanguins (*V*) et aux cellules de l'endoderme vitellin (*Ev*). *E*, noyau d'une cellule endothéliale. 940 diam.

(1) Schneider, *Abh. Ak. Wiss. Berlin*, 1888 ; — Dubuisson, *Arch. Zool. exp.* 1906 ; — Wassermann, *An. Hefte*, 1910, p. 281. Le fer n'est pas limité au vitellus des cellules endodermiques sous-jacentes aux îlots sanguins, mais à toute l'épaisseur du vitellus.

(2) Hugounenq et A. Morel, *C. R. Ac. des sc.*, 20 novembre 1905 et *J. de Physiologie*, VIII, 1906. Chez tous les Vertébrés, au fur et à mesure de l'apparition de l'hémoglobine dans les premières cellules sanguines, le noyau diminue graduellement de volume. On peut supposer qu'il abandonne au cytoplasme, au cours de cette évolution, des matériaux utilisés dans la formation de l'hémoglobine. Cette manière de voir est d'accord avec les résultats comparés de l'analyse chimique des noyaux et de l'hémoglobine. Certains auteurs ont voulu faire jouer un rôle aux mitochondries dans la formation de l'hémoglobine (Schridde; *An. Anzeiger*, XLII, 1912 ; M. Prenant, *Soc. de Biologie*, 19 novembre 1921 ; Romieu, *Soc. de Biologie*, 14 janvier 1922).

laires de l'aire vasculaire (1), on voit apparaître des cellules à noyau arrondi et à protoplasma basophile qui ont beaucoup de ressemblance avec les cellules sanguines primitives et qui en tout cas ne sont pas différentes des *cellules lymphoïdes primordiales* ou germinales. Il est très possible qu'un certain nombre de ces cellules proviennent des ébauches sanguines au moment de la formation de la paroi endothéliale (2), mais la plupart semblent provenir directement des cellules mésenchymateuses situées entre les îlots sanguins. A partir du 3e ou 4e jour, on voit certaines de ces cellules lymphoïdes primordiales élaborer, dans leur cytoplasme, des granulations acidophiles rondes, par un mécanisme que nous retrouverons plus tard, non seulement dans les organes hématopoiétiques, mais dans tout le tissu conjonctif de l'embryon. Il se forme ainsi, de bonne heure, entre les capillaires du sac vitellin, des groupes de cellules volumineuses, à gros noyau ovalaire pourvu d'un nucléole, à protoplasma rempli de grains acidophiles, et dont quelques-unes se transforment déjà en leucocytes granuleux à noyau polymorphe. Ces grains subissent une maturation : ils prennent la forme allongée en grain de blé en même temps que leurs réactions se modifient : d'abord basophiles, arrondis, puis facultativement acidophiles et facilement solubles, ils deviennent ensuite, lorsque leur forme est cristalloïde, purement acidophiles et insolubles.

Hématopoièse dans le sac vitellin. — La formation de l'aire vasculaire à la surface du vitellus sur lequel elle s'étale est un phénomène en rapport étroit avec la nutrition de l'embryon. Cette grande nappe de vaisseaux puise le matériel nutritif qu'elle amène à l'embryon. Au fur et à mesure des progrès du développement, cette nappe s'étend sur la sphère vitelline dont elle atteint l'équateur à la fin du 4e jour ; le blastoderme s'avance beaucoup plus loin, enveloppant presque tout le jaune, dont il ne reste à nu que le pôle exactement opposé à l'embryon (ombilic ombilical). Jusqu'ici, le jaune est resté à l'état de sphère, comme dans l'œuf non incubé. A partir du 5e jour sa consistance diminue, l'aire vasculaire l'enveloppe de plus en plus ; le vitellus se trouve ainsi contenu dans une grande poche flasque, sur laquelle l'embryon repose comme sur un matelas qu'il déprime : c'est le *sac vitellin* (vésicule ombilicale), dont la paroi

(1) Correspondant aux « îlots de substance » des anciens auteurs.

(2) Pour Dantschakoff, le plus grand nombre sont des cellules sanguines primitives qui ont émigré hors des vaisseaux.

est constituée par l'endoderme, la couche vasculaire et le feuillet viscéral du mésoderme extra-embryonnaire. L'allantoïde n'est encore qu'un petit sac peu développé ; en augmentant de volume dans les stades suivants, elle s'insinue entre le sac vitellin et le feuillet ectodermique. Elle contient des vaisseaux propres ; sa paroi externe s'accole à la coquille et forme cette membrane richement vascularisée qu'on voit adhérente à la face interne de la membrane coquillière quand on ouvre un œuf dans la deuxième moitié de l'incubation.

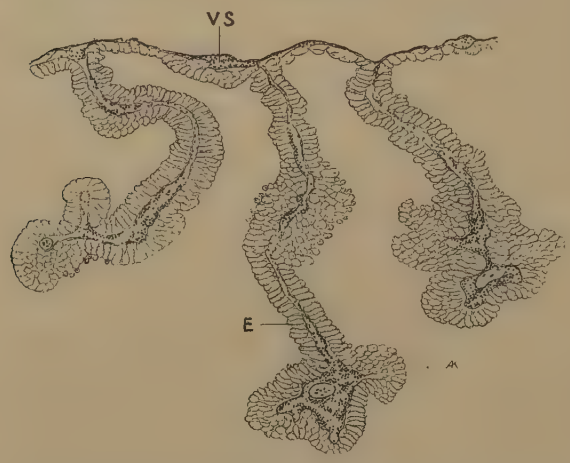


Fig. 342. — Embryon de poulet du 11e jour. Coupe du sac vitellin montrant les franges qui plongent dans le vitellus.

Vs, vaisseau sanguin ; — *E*, épithélium endodermique. Les vaisseaux des franges sont le siège d'une hématopoièse intense 40 diam.

Au 9e jour, l'aire vasculaire recouvre presque toute la surface du sac vitellin sauf au niveau du pôle distal (ombilic ombilical) qu'entoure le sinus marginal formant un cercle très étroit. A ce niveau, le vitellus est au contact de l'albumine que les progrès du développement de l'allantoïde ont refoulée au petit bout de l'œuf. A ce moment est apparue une disposition remarquable : dès le 5e jour, et même plus tôt, les artères vitellines s'enfoncent dans le vitellus, entraînant avec elles le feuillet endodermique. Ainsi se trouvent consti-

Fig. 343. — Embryon de poulet du 11e jour. Coupe de la paroi du sac vitellin au niveau d'une petite frange. Le vaisseau qu'elle contient est presque entièrement rempli de cellules sanguines indifférentes.

En, endoderme vitellin ; — *Ec*, ectoderme ; — *V*, vaisseau sanguin. 375 diam.

tuées des saillies longitudinales, crêtes vasculaires courant dans une direction radiée méridionale comme les artères vitellines et se ramifiant en éventail vers le sinus marginal. Ces franges lamelleuses s'aperçoivent facilement lorsqu'on a ouvert le sac vitellin dans l'eau salée et qu'après l'avoir agité pour le débarrasser du vitellus, on regarde sa face interne.

Comme on s'en rend compte sur des coupes, certaines de ces crêtes sont de simples plis, mais la plupart sont de véritables mésos contenant l'artère environnée d'un réseau capillaire ; le tout est revêtu, du côté du vitellus, d'une couche de hautes cellules endodermiques, gonflées de gouttelettes lipoïdes et de grains vitellins. Au fur et à mesure du développement, ces crêtes se ramifient et forment des franges plus ou moins compliquées.

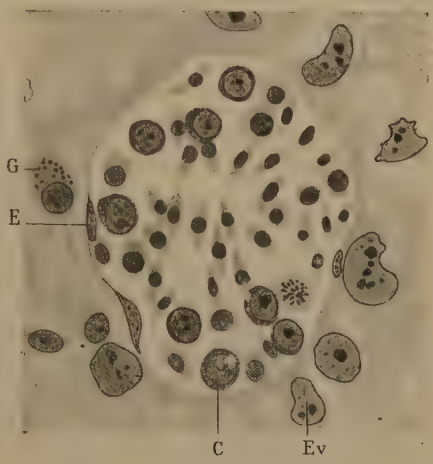


Fig. 344. — Embryon de poulet du 11e jour. Coupe de la paroi du sac vitellin. Vaisseau sanguin contenu dans une frange et sectionné transversalement.

C, cellules sanguines primitives ou indifférentes, surtout appliquées contre la paroi vasculaire; les hématies définitives occupent plutôt le centre de la lumière du vaisseau ; à côté d'elles, on voit les hématies primordiales, reconnaissables à leur forme ronde et à leur protoplasma non basophile; — *E*, cellule endothéliale; — *Ev*, noyaux de l'endoderme vitellin; — *G*, granulocyte situé dans le tissu conjonctif extra-vasculaire. 750 diam.

Cette disposition remarquable est destinée bien évidemment à la résorption du vitellus ; elle multiplie la surface d'absorption et ces franges sont comparables à des villosités intestinales. Mais de plus, le réseau capillaire de ces franges est le siège d'une hémopoièse intense qui prolonge presque jusqu'à la fin de l'incubation, le rôle hémopoiétique des vaisseaux de l'aire vasculaire (1). Les capillaires qui entourent l'artère sont bourrés de cellules sanguines primitives, souvent accumulées contre la paroi du vaisseau, tandis que les hématies définitives occupent le centre de la lumière vasculaire. A côté de ces cellules, on voit toutes les formes de transition que nous avons décrites plus haut. Dans le tissu mésenchymateux des plis, on voit se former des leucocytes granuleux, aux dépens de cellules lymphoïdes primordiales. Il semble aussi que les cellules

(1) Ces faits sont analogues à ceux que nous avons vu plus haut chez le lapin où le sac vitellin présente aussi des crêtes vasculaires faisant saillie dans le liquide vitellin ; elles sont seulement beaucoup moins développées que chez le poulet.

sanguines primitives soient capables d'en former, dans les vaisseaux mêmes.

Cette hématopoièse du sac vitellin est un phénomène qui résulte surtout des conditions particulières de la circulation, ralentie dans le territoire des capillaires vitellins. Par suite de la richesse de ces vaisseaux et des dimensions considérables du sac, elle prend une

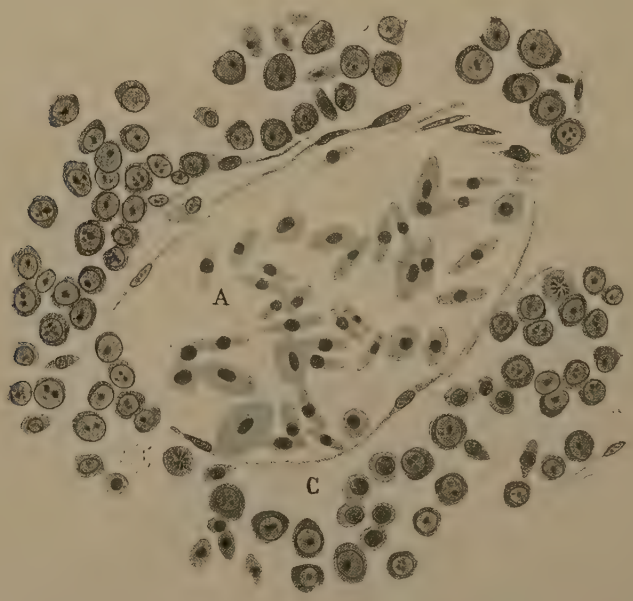


Fig. 345. — Embryon de poulet du 11e jour. Sac vitellin. Coupe d'une longue frange au niveau de son extrémité libre. Comparer avec fig. 342.

A, Artériole, dont la lumière est presque entièrement remplie d'hématies définitives; — *C*, capillaires et sinus veineux contenant surtout des formes immatures, cellules sanguines indifférentes à protoplasma basophile, et hématies primordiales, rondes à protoplasma clair, hémoglobique. 340 diam.

part importante à la formation du sang de l'embryon. Elle atteint son maximum au 11e ou 12e jour ; vers le 18e jour, elle diminue, mais elle persiste en somme pendant la plus grande partie de l'incubation.

Distribution des cellules sanguines dans les vaisseaux de l'embryon. Hématopoièse dans l'embryon. — Dès que s'établit la circulation vitelline (2e jour), les cellules sanguines formées dans l'aire vasculaire arrivent au cœur par les veines vitellines, et sont envoyées de là dans toutes les parties du corps de l'embryon. Assez rares d'abord dans le plasma, elles augmentent rapidement de nombre.

La composition du sang de l'embryon dépend naturellement des progrès de l'évolution des cellules sanguines dans l'aire vasculaire et le sac vitellin. Mais elle n'est pas semblable à la composition du sang des vaisseaux vitellins. D'une manière générale, le sang de l'embryon contient beaucoup plus de cellules mûres, dont l'évolution est terminée. Pendant les premières stades de la circulation, les veines vitellines apportent à l'embryon surtout des hématies primitives, arrondies, lenticulaires, aux différents stades de leur évolution ; les cellules sanguines primitives incolores, qui dominent dans le réseau de l'aire vasculaire, sont toujours rares dans le sang de l'embryon. Dans les artères vitellines qui ramènent à l'aire vasculaire le sang de l'embryon, les cellules immatures (1 sont plus rares que dans les veines vitellines. Les hématies primordiales apportées au cœur achèvent leur évolution dans les vaisseaux de l'embryon qui lui-même, ne fabrique pas directement d'hématies à cette période de la vie. Au 4e jour environ, les hématies définitives, ovalaires, commencent à apparaître dans la circulation de l'embryon. A partir du 5e jour, elles commencent à dominer tandis que les hématies primordiales disparaissent assez vite.

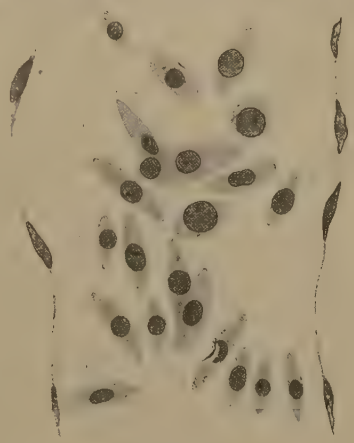


Fig. 346. — Embryon de poulet du 6e jour. Aire vasculaire examinée à plat. Vaisseau contenant surtout des cellules sanguines très avancées dans leur évolution. Formes de passage entre les hématies primordiales et les hématies définitives. 1.000 diam.

Le sang de l'embryon ne contient encore qu'un très petit nombre de cellules lymphatiques. Ce sont des cellules lymphoïdes analogues aux cellules sanguines primitives. Les leucocytes véritables (petits lymphocytes, leucocytes granuleux) de même que les mastzelles et les cellules fusiformes (thrombocytes) n'apparaissent dans le sang embryonnaire que pendant les derniers jours de l'incubation.

A partir du 12e jour de l'incubation environ, la rate commence à fonctionner comme organe hématopoiétique. Elle fabrique des lymphocytes, des leucocytes granuleux et des hématies aux dépens de cellules lymphoïdes très semblables aux grosses cellules lymphoïdes de l'aire vasculaire, et qui sont nées sur place par transformation de

(1) Hématies primordiales peu riches en hémoglobine, ou érythroblastes.

cellules mésenchymateuses. Cette hématopoièse splénique, que nous étudierons plus en détail, est surtout intense entre le 14e et le 18 jour ; elle s'atténue à la fin de l'incubation. A ce moment, la moelle osseuse est apparue et fonctionne depuis le 12e jour environ. Loin de s'atténuer, cette hématopoièse médullaire ne fait que s'accroître dans les derniers jours de l'incubation et se trouve, au moment de l'éclosion, le foyer principal de formation du sang.

Le foie, contrairement à ce qui se passe chez les Mammifères, n'est pas un organe hématopoiétique chez l'embryon des Oiseaux (1). Mais tout le mésenchyme disséminé dans les différentes parties du corps, peut pendant la vie embryonnaire fabriquer des cellules sanguines. Ce phénomène est limité, dans les premiers jours, au mésenchyme de la tête ; à partir du 4e au 5e jour, ces faits s'étendent à la région du tronc, surtout au voisinage de l'aorte et à d'autres parties du corps, toujours de préférence au voisinage des vaisseaux, où jusqu'au 18e jour et même après, les cellules mésenchymateuses sont capables de former, non seulement des cellules lymphoïdes mais des leucocytes granuleux et des hématies. Cette formation des leucocytes granuleux, à la fin de l'incubation, se localise en des points plus limités, mais peut être retrouvée dans certains organes, comme la bourse de Fabricius (v. ch. xv). Nous aurons l'occasion de revenir sur ces faits quand nous étudierons les rapports du mésenchyme et du tissu conjonctif avec la formation du sang (v. chapitre xi).

Fig. 347. — Embryon de poulet du 14e jour. Rate. Bichromate formol, hématoxyline au fer. Jeune hématie en caryocinèse. Les centrosomes sont très apparents. 1.500 diam.

ÉBAUCHES SANGUINES DES REPTILES

La formation embryonnaire du sang, chez les Reptiles, ressemble beaucoup à celle des Oiseaux. Les Reptiles ont, comme les Oiseaux, des œufs à vitellus très abondant. Les ébauches sanguines se forment à la surface du vitellus, en dehors de l'embryon, dans la partie périphérique du blastoderme constituant une aire vasculaire dont les vaisseaux s'unissent secondairement à l'embryon. La formation des ébauches et l'évolution des cellules sanguines sont tout à fait les mêmes que chez les Oiseaux.

La plupart des reptiles pondent leurs œufs qu'ils abandonnent dans la terre, l'herbe ou la mousse, et qui éclosent spontanément. Les œufs sont fécondés dans l'oviducte, à la suite de l'accouplement, comme chez les oiseaux. Mais chez la

(1) Son rôle est, en tout cas, très secondaire.

plupart des reptiles ovipares, le développement de l'embryon commence dans l'oviducte dont la partie inférieure forme, quelquefois, une véritable poche incubatrice. Pour obtenir les premiers stades, nécessaires à l'étude de la formation des ébauches sanguines, il faut donc ouvrir au hasard, à la saison favorable, un certain nombre de femelles de la même espèce et mettre ensuite les embryons en série suivant l'état de leur développement (1).

Beaucoup de reptiles sont ovo-vivipares et quelques-uns sont vivipares. Les œufs sont enveloppés d'une coque membraneuse résistante, parcheminée, qui remplace la coquille calcaire des Oiseaux ; ils possèdent, comme les Oiseaux, amnios et allantoïde. La technique à suivre pour recueillir et fixer l'embryon et le sac vitellin ne diffère pas beaucoup de celle que nous avons indiquée pour le poulet.

L'époque de la fécondation, pour la plupart des lézards de nos pays, est le début de mai (2). L'œuf ovarien, arrivé à maturité, est un gros globule jaune de 6 à 7 millimètres de diamètre qui présente une tache blanche germinative. Les œufs fécondés s'entourent, dans l'oviducte, d'une couche d'albumine, puis d'une coque membraneuse, d'abord mince et transparente et qui augmente plus tard d'épaisseur, plus ou moins, suivant les espèces. La segmentation commence dans l'oviducte. En ouvrant des femelles en mai et juin, on aura des chances de tomber sur les phases de la formation de l'aire vasculaire.

L'œuf est, en général, pondu en juillet-août. Au moment de la ponte, l'embryon est déjà très avancé dans son développement. Chez certaines espèces, la coque est assez mince pour qu'on puisse reconnaître sa place avant d'ouvrir l'œuf. Chez d'autres, la coque est trop épaisse. On incise un peu au hasard, il s'écoule une certaine quantité d'albumine ; on découvre la place de l'embryon qui apparaît couché sur le côté, un peu enfoncé dans une dépression du vitellus. Il est entouré d'une aire vasculaire très développée dont les vaisseaux recouvrent déjà presque tout le vitellus ; l'œil, les ébauches des membres, les arcs branchiaux sont formés ; la queue est enroulée sur elle-même et donne un aspect caractéristique à l'embryon ; le cœur bat et la circulation vitelline peut être suivie à la loupe. L'éclosion a lieu à la fin de septembre ou au début d'octobre.

Il semble que le moment de l'éclosion corresponde à peu près au stade où la circulation vitelline est arrivée à son complet développement, et où la circulation allantoïdienne, qui, comme chez les Oiseaux, possède une fonction respiratoire, commence à se former. Mais on observe, à ce sujet, de grandes variations.

Chez la couleuvre commune (*Tropidonotus natrix*), comme chez nos lézards, l'embryon commence à se développer dans le corps de la mère, au printemps. Les œufs sont pondus en juillet et déposés dans la terre humide sous des feuilles sèches ou du crottin ; ils ont une coque parcheminée blanchâtre et contiennent, à ce moment, un embryon déjà bien développé et enroulé sur lui-même. L'éclosion spontanée n'a lieu qu'à la fin de l'été ou au début de l'automne.

Première apparition des ébauches sanguines. — Les premières ébauches sanguines apparaissent de très bonne heure, à un stade où l'embryon ne possède encore aucune protovertèbre (3).

(1) Blastopore, gouttière primitive, prolongement céphalique, nombre de protovertèbres, et pour les phases avancées, longueur de la tête.

(2) Lézard gris des murailles (*Lacerta agilis*), lézard vert (*Lacerta viridis*) ; de même pour l'orvet (*Anguis fragilis*).

(3) Strahl, *Archiv. f. An.* 1882 et 1883. *Zeitschrift. wiss. Zool.* 1887 ; — Schauinsland, *An. Angeiger* XV, 1899 ; — Rückert, in *Hertwig's Handbuch der vergl. u. exp. Entwickelungslehre*, 1906.

Au niveau de son bord postérieur (extrémité caudale), l'écusson embryonnaire présente une petite surface aplatie, la *plaque primitive*, au devant de laquelle on aperçoit une dépression plus ou moins profonde, le *blastopore*. Plaque primitive et dépression correspondent à la ligne primitive et à la gouttière primitive des Vertèbrés supérieurs (1). L'invagination blastoporique présente un bord antérieur saillant (lèvre dorsale du blastopore), tandis que le bord postérieur se continue sans démarcation avec la surface de la plaque primitive. Le mésoderme prend naissance en cette région. Parti du bord postérieur et des bords latéraux de la plaque primitive et de l'invagination blastoporique, il s'avance dans l'espace fissuré qui sépare l'ectoderme et l'endoderme.

Fig. 348. — Disque germinatif de gecko (*Platydactylus*) vu à plat et montrant les premières ébauches sanguines qui paraissent se détacher de la lèvre ventrale du blastopore. D'après Rückert.

L'écusson embryonnaire est entouré d'une zone plus claire, l'aire transparente, en dehors de laquelle se trouve l'aire vitelline, opaque.

Les premières ébauches sanguines apparaissent comme des taches sombres, en dehors de l'écusson embryonnaire, en arrière du blastopore, dans une région où le mésoblaste périphérique, parti des lèvres du blastopore, a déjà pénétré. Dans les stades suivants, ces ébauches progressent d'arrière en avant et de chaque côté, gagnent les parties latérales de l'embryon. Elles forment alors, par leur ensemble, comme chez le poulet, un fer à cheval ouvert en avant qui entoure, en arrière et de chaque côté, le jeune embryon. En avant, les extrémités du fer à cheval dépassent l'embryon et embrassent une portion du disque germinatif privée de mésoblaste et dans laquelle se formera l'amnios.

Sur des coupes transversales du disque germinatif, les ébauches sanguines apparaissent, comme chez les Oiseaux, sous forme d'épaississements localisés du feuillet mésoblastique, dans sa portion extra-embryonnaire : au niveau de ces épaississements, les cellules mésodermiques sont plus massives et plus serrées (2).

Différenciation des îlots sanguins. — Lorsque les premières protovertèbres sont apparues, on commence à apercevoir une différenciation dans les îlots sanguins : les cellules périphériques s'aplatissent pour former des cellules endothéliales et les cellules centrales deviennent des cellules sanguines. En même temps, les premières traces de la cavité cœlomique apparaissent. Comme chez les Oiseaux, la formation de cette cavité est discontinue et constitue d'abord un système de lacunes isolées qui progresse d'avant en arrière et de dedans en dehors, arrivant au contact de la surface des îlots les plus internes. En même temps, entre

(1) Et par conséquent à la bouche primitive de la gastrula. Cette dépression s'approfondit et forme, chez certains reptiles, une petite poche creuse qui s'insinue dans l'espace fissuré séparant l'endoderme et l'ectoderme. C'est le sac mésodermique, particulièrement net chez la couleuvre et qui, chez les lézards, est transformé en un canal à parois épaisses, correspondant au canal chordal des Mammifères.

(1) Tout en reconnaissant l'origine mésodermique des îlots sanguins des Reptiles, Ruckert admet cependant (*Platidactylus*, *lacerta*) que les îlots les plus antérieurs naissent de l'endoderme. Schalinsland admet, de même, chez *Hatteria* une participation secondaire de l'endoderme. Strahl, Wenckebach, chez *Lacerta*, attribuent l'origine des îlots sanguins uniquement au mésoderme.

la zone des îlots sanguins et l'embryon, se développent, aux dépens du mésoderme, des ébauches vasculaires qui ne forment pas de cellules sanguines, et qui, secondairement, s'unissent aux îlots sanguins, puis à l'embryon.

Ainsi se constitue, autour de l'embryon, un réseau vasculaire, limité en dehors par un sinus marginal, en dedans par un cercle veineux formé par les deux veines vitellines qui réunissent l'aire vasculaire au cœur. Plus tard, les deux veines vitellines s'ouvrent l'une dans l'autre, en même temps qu'elles contractent une union secondaire avec le sinus marginal; finalement, il n'y a plus qu'une veine vitelline gauche qui semble la continuation du sinus marginal. Quant aux artères vitellines, ce sont des formations nouvelles; elles sont multiples et constituées par de nombreuses branches transversales parties de l'aorte sur presque toute la longueur du tronc et qui atteignent l'aire vasculaire en s'étalant en éventail de chaque côté de l'embryon.

Évolution des cellules sanguines primitives. Hématies primordiales, hématies définitives. — Les cellules nées de la dislocation des îlots sanguins sont les *cellules sanguines primitives*. Elles se trouvent, comme chez les Mammifères et les Oiseaux, de prime abord, placées dans le plasma sanguin et contenues dans les vaisseaux. Elles ont les mêmes caractères que chez les Oiseaux et subissent la même évolution. Elles se transforment d'abord en cellules globuleuses hémoglobiques, les *hématies primordiales* qui s'aplatissent ensuite et deviennent discoïdes et forment les *hématies définitives*. On trouve tous les stades intermédiaires de cette évolution.

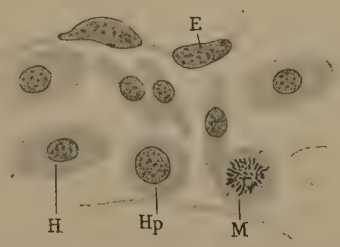


Fig. 349. — Embryon d'orvet. Réseau vasculaire du sac vitellin.

Hp, hématie primordiale; — *M*, hématie primordiale en mitose; — *H*, hématie définitive; — *E*, cellule endothéliale. 940 diam.

Comme chez les Oiseaux, le rôle hémopoiétique des vaisseaux du sac vitellin persiste pendant longtemps chez les Reptiles. Ces vaisseaux résorbent activement le vitellus en même temps qu'ils fabriquent des globules rouges. La paroi endodermique du sac vitellin envoie dans l'épaisseur du vitellus des franges vasculaires, bien étudiées chez la couleuvre (1) et qui jouent le même rôle que chez le poulet.

Dans les vaisseaux du sac vitellin, les cellules sanguines primitives continuent à se multiplier activement et à former des hématies primordiales qui pendant les premiers stades de leur évolution se multiplient aussi et montrent de nombreuses mitoses. Dans le mésenchyme qui sépare les vaisseaux, on voit des cellules lymphoïdes primordiales, nées des cellules mésoblastiques et qui forment des leucocytes granuleux par un mécanisme analogue à celui que nous avons étudié plus haut chez les Oiseaux (2). Leurs granulations acidophiles subissent une évolution analogue.

Chez les reptiles ovo-vivipares, le rôle hémopoiétique du sac vitellin n'est pas encore

(1) Dantschakoff, *Archiv. f. Anatomie*, LXXXVII, 1916.

(2) D'après les recherches de Jordan et Flippin chez les Chéloniens (*Folia haematologica*, XV, 1913), les cellules sanguines primitives seraient capables, à un stade précoce, de former directement des granulocytes, dans le sang même.

terminé au moment de l'éclosion, qui survient du reste à un stade de développement un peu variable. A ce moment, le mésenchyme de l'embryon, en différents points, forme des leucocytes, comme le mésenchyme du sac vitellin. La rate est apparue, et comme chez le poulet à la fin de l'incubation, elle fabrique aussi des leucocytes granuleux. Enfin, en dernier, la moelle osseuse intervient, et elle remplace peu à peu la fonction hémopoiétique du sac vitellin. Le foie embryonnaire chez les Reptiles comme chez les Oiseaux, ne semble jouer aucun rôle particulier dans la formation du sang.

ÉBAUCHES SANGUINES DES POISSONS ET DES BATRACIENS

Les faits que nous avons étudiés chez les Sauropsidés pourraient à la rigueur nous dispenser d'insister sur la formation embryonnaire du sang chez les Vertébrés inférieurs. Ici encore, les cellules nées de la dislocation des ébauches sanguines mésodermiques sont constituées par des éléments libres, sans hémoglobine, à protoplasma basophile, qui se transforment progressivement, d'abord en hématies arrondies et plus tard hématies elliptiques définitives. Ces trois stades sont identiques à ceux que nous avons vus chez les Oiseaux et les Reptiles. Mais la formation des ébauches sanguines présente chez les Poissons et chez les Batraciens, des particularités si intéressantes, qu'elle doit nous arrêter un instant.

Sélaciens. — Chez les Sélaciens, la fécondation des œufs se fait dans l'utérus après l'accouplement. Certaines espèces sont vivipares ; en ouvrant les femelles on récolte des œufs à différents stades de développement. D'autres sont ovipares ; les œufs qu'on trouve dans l'utérus sont fécondés mais n'ont le plus souvent subi aucune segmentation. En plaçant ces œufs à plat dans un grand cristallisoir rempli à moitié d'eau de mer, on peut en suivre le développement et fixer les disques germinatifs aux stades intéressants pour le développement du sang. L'œuf a la forme d'un petit sachet quadrangulaire aplati sur deux faces et présentant à chaque angle un prolongement filamenteux. Son enveloppe cornée, translucide, contient un vitellus ou jaune analogue à celui des Oiseaux, ovoïde et aplati, qui nage dans un liquide albumineux et qui présente une vésicule germinative apparaissant comme une tache blanche, arrondie, à la surface du jaune. L'embryon, contrairement à celui des Oiseaux, n'a pas la faculté de se présenter toujours facilement à l'observateur, car le vitellus ne peut tourner sur lui-même.

L'enveloppe cornée est translucide mais non transparente. Pour repérer la situation de l'embryon, on procédera de la façon suivante : l'œuf étant tenu à plat dans le creux de la main gauche, on amincit la coque membraneuse ; avec un rasoir, on enlève de minces copeaux superficiels ; en éclairant convenablement la surface de l'œuf, on peut observer l'embryon ; on repère sa situation et son stade de développement. Avec de fins ciseaux, on découpe alors, en dehors du vitellus, un large volet. Ayant fait écouler ensuite l'albumine liquide et glaireuse, on plonge dou-

cement l'œuf dans une soucoupe profonde remplie du fixateur (bichromate-sublimé-formol de préférence) ; on le laisse le temps nécessaire pour que le vitellus, très fragile, ait pris, à la surface une certaine consistance, ce qui survient en général après 15 ou 20 minutes. On découpe alors, avec de fins ciseaux bien pointus, le blastoderme, en passant en dehors de lui, et en taillant dans le vitellus dont les parties profondes sont encore molles et se répandent. Le blastoderme est recueilli avec une spatule plate et porté dans un cristallisoir rempli du même fixateur. Lorsque la fixation est complète, ce qui arrive en 1 heure et demie environ pour les jeunes stades, on porte avec la spatule le blastoderme dans l'eau salée à 6 p. 1.000 et on cherche à le débarrasser, par une légère agitation, de la plus grande partie du vitellus qui gênerait les observations ultérieures et empêcherait la confection des coupes. Lorsque le développement est plus avancé, le sac vitellin est ouvert dans l'eau salée, débarrassé de son vitellus et fixé ensuite comme toute autre membrane ; la technique ne diffère pas alors de celle que nous avons indiquée pour l'embryon du poulet.

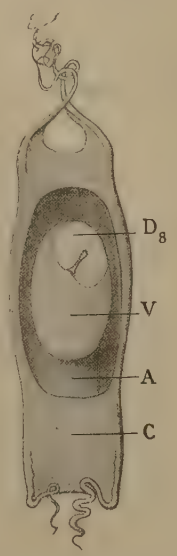


Fig. 350. — Œuf de sélacien (*Scyllium canicula*) ouvert, au stade où se forment les ébauches sanguines.

C, coque, dans laquelle on a découpé une ouverture ; — *V*, vitellus ; — *Dg*, disque germinatif avec l'embryon ; — *A*, albumine entourant le vitellus. Légèrement réduit.

La segmentation de la vésicule germinative aboutit à la formation d'un disque germinatif qui s'étend à la surface du vitellus ; l'embryon apparaît au bord postérieur du disque et se développe ensuite suivant l'axe de ce dernier, d'arrière en avant. En même temps, le blastoderme s'étend progressivement sur le vitellus qu'il finit par envelopper complètement. L'embryon fait à la surface du vitellus un relief de plus en plus prononcé ; finalement, le sac vitellin s'étrangle au niveau du point où il est relié au tube digestif : il apparaît alors suspendu au ventre du jeune poisson par un pédicule plus ou moins long.

Les ébauches sanguines apparaissent, comme chez les Sauropsidés, à la surface du vitellus, loin de l'embryon, à un stade très précoce et à un moment où l'embryon ne possède pas encore de protovertèbres. Le disque germinatif présente alors la forme d'un écusson dont le bord postérieur, légèrement échancré, porte l'embryon. Les premières ébauches sanguines apparaissent au pourtour du disque (1). Leur ensemble constitue chez la torpille, un fer à cheval, dont la cavité regardant l'extrémité postérieure du disque, embrasse l'embryon.

Comme le montrent les coupes transversales du disque germinatif, ces ébauches sanguines sont constituées par des épaississements du mésoblaste extra-embryonnaire (2). L'origine de celui-ci est encore discutée. Tandis que pour la plupart des auteurs, il naît de la gouttière blastoporique et s'avance de là entre les deux

(1) Chez la torpille, les premières ébauches paraissent se former d'abord le long du bord antérieur du disque germinatif ; chez les Squalides, dont l'aire vasculaire a été moins étudiée que celle des Rajidés, la zone qui contient les ébauches sanguines semble limitée au segment postérieur du disque germinatif. Cf. Emmert, *Archiv. f. mikr. An.* LVI, 1900.

(2) Van der Stricht, *Soc. de Biologie*, 14 mars 1896.

feuillets primaires, comme nous l'avons vu pour les Vertébrés supérieurs, pour *Rückert*, il se détacherait de l'endoderme par délamination (1). Au moment où apparaissent les ébauches sanguines, cette délamination ne serait pas encore complètement terminée, de sorte que l'endoderme interviendrait directement dans la formation des ébauches. Pendant quelque temps, l'endoderme serait capable d'envoyer des bourgeons vers le mésoblaste et de jouer un rôle dans son extension. Cette manière de voir ne doit être acceptée qu'avec quelques réserves ; il est probable que les relations des ébauches sanguines avec l'endoderme sont surtout secondaires ; et si l'endoderme livre au mésoblaste et aux ébauches sanguines un certain nombre de cellules, ce n'est là probablement qu'un phénomène accessoire (2).

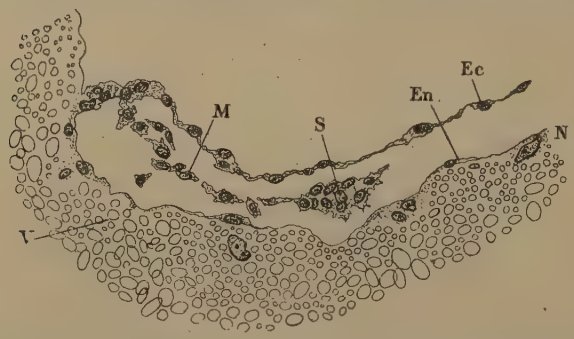


Fig. 351. — *Scyllium canicula*. Coupe transversale du disque germinatif; portion marginale. Début de la formation d'une ébauche sanguine aux dépens du mésoderme extra-embryonnaire.

Ec, ectoderme; — *En*, endoderme; — *M*, mésoderme périphérique; — *S*, ébauche sanguine en voie de formation; — *V*, masse vitelline; — *N*, noyaux vitellins. 225 diam.

Les cellules superficielles de l'ébauche se transforment en cellules endothéliales, les centrales en cellules sanguines. La couche mésodermique qui passe au-dessus contribue aussi probablement à former la paroi endothéliale. Les îlots constitués se trouvent directement au contact de l'endoderme. Lorsqu'ils sont complètement entourés d'un revêtement endothélial, on voit apparaître dans leur intérieur des espaces remplis d'un liquide qui représente le premier plasma sanguin et qui dissocie les cellules sanguines.

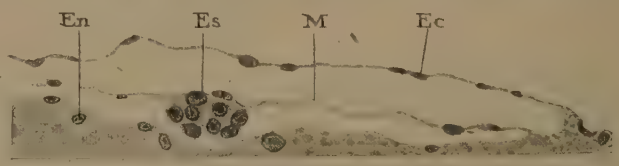


Fig. 352. — Embryon de *scyllium canicula*. Coupe transversale du disque germinatif; portion marginale.

Es, ébauche sanguine formée aux dépens du mésoderme périphérique (*M*); — *Ec*, ectoderme; — *En*, endoderme. 225 diam.

En même temps, on voit se former, dans toute l'étendue de l'aire vasculaire, des ébauches vasculaires vides de sang ; ces tubes endothéliaux font communiquer

(1) Rückert, *Hertwig's Handbuch*, 1906.

(2) Le germe, en s'étendant progressivement à la surface du vitellus, qu'il enveloppe, est formé d'abord, à ce niveau, d'une seule couche de cellules aplatiès, l'*endoblaste*, à la formation duquel les noyaux vitellins ne prennent aucune part. Ce feuillet primitif (endoderme primitif, endoblaste) se délaminerait ensuite en un mésoblaste et en un endoderme secondaire (hypoblaste). (Rückert, Swaen, Brachet.) D'après cette conception, l'origine endodermique ou mésodermique des ébauches sanguines, proviendrait seulement de la précocité plus ou mois grande de la délamination du feuillet moyen.

les ébauches sanguines devenues creuses avec les vaisseaux du corps de l'embryon,

A la périphérie de l'aire vasculaire, le réseau sanguin est limité par un large vaisseau circulaire, le *sinus marginal*, homologue du sinus marginal de l'aire vasculaire du poulet. D'après les recherches de *Rückert*, ce sinus ne serait pas formé, comme on pourrait le supposer, par la confluence des ébauches sanguines périphériques. Il serait d'abord représenté par une gouttière de l'endoderme située en dehors des ébauches sanguines, gouttière qui plus tard serait transformée en un tube endothélial par des cellules mésodermiques.

Chez la torpille, les extrémités du sinus marginal forment les veines vitellines postérieures qui se prolongent dans le corps de l'embryon sous forme de deux veines sous-intestinales. Un deuxième cercle veineux (sinus marginal interne) limite la partie centrale du disque germinatif en avant de l'embryon ; les extrémités de ce cercle veineux interne forment les veines vitellines antérieures. Celles-ci ne tardent pas à perdre leurs connexions primitives avec le cœur ; elles en acquièrent de nouvelles avec l'aorte et se transforment en artères vitellines.

Les *cellules sanguines primitives* nées de la dissociation des îlots sanguins sont des éléments sans hémoglobine, absolument semblables aux cellules sanguines primitives des Sauropsidés. Elles se transforment progressivement, en dehors des vaisseaux, en *hématies primordiales*, éléments hémoglobiques arrondis, et en hématies elliptiques, discoïdes, les *hématies définitives*. Dans le mésenchyme qui sépare les vaisseaux, on trouve aussi, comme chez les Sauropsidés, de gros éléments lymphoïdes à protoplasma basophile provenant des cellules mésodermiques ou peut-être des îlots, et qui donnent naissance à des leucocytes à granulations acidophiles et à des lymphocytes que l'on retrouve dans la circulation à des stades plus tardifs. Dans les vaisseaux de l'aire vasculaire, les cellules sanguines primitives continuent à se diviser ; on les retrouve pendant longtemps encore à côté des hématies primordiales et des hématies définitives auxquelles elles ont donné naissance. D'après les recherches de *Maximoff* (1) chez *Acanthias*, elles seraient capables de donner naissance directement, dans le sang même, à des lymphocytes. Quant aux cellules fusiformes (thrombocytes), elles n'apparaissent que plus tard encore et paraissent se former aux dépens de petits lymphocytes.

L'hématopoièse dans le sac vitellin persiste longtemps. On ne tarde pas cependant à voir apparaître dans le mésenchyme de l'embryon des foyers de cellules lymphoïdes qui se différencient directement aux dépens des jeunes cellules conjonctives. Ces foyers sont disséminés en différents points, au niveau du tube digestif, de l'œsophage, du pronéphros ; leurs cellules forment des lymphocytes granuleux. En même temps se développe la rate ; on peut trouver, dans ses vaisseaux, de jeunes stades de la formation des hématies ; mais elle forme surtout des lymphocytes.

Téléostéens. — Au point de vue de la formation des ébauches sanguines, les Poissons osseux constituent une exception. Tandis que chez les autres vertébrés à gros œufs méroblastiques, le sang, comme nous l'avons vu, apparaît d'abord en dehors de l'embryon, à la surface du vitellus, chez les Téléostéens, les ébauches sanguines se forment dans le corps de l'embryon.

Les poissons d'eau douce ont en général de gros œufs riches en vitellus dont le

(1) Maximoff, *An. Gesellschaft*, 2e Congrès int. des Anatomistes, Bruxelles, 1910.

développement est lent. Ces circonstances, ajoutées à la facilité de renouveler un milieu d'eau douce dans n'importe quel laboratoire, les rendent plus propres à cette recherche que les poissons marins qui souvent ont des œufs très petits et à développement rapide. Les œufs des Salmonidés sont un objet de choix. Il est facile d'obtenir des établissements de pisciculture des œufs de truite fécondés *in vitro*. La ponte de la truite commune (*Trutta fario*) a lieu ordinairement en novembre-décembre. Les œufs qui viennent d'être fécondés sont transportés avec précautions dans la mousse humide ou l'ouate mouillée. Ils sont placés sur des claies de verre, dans des bacs de terre, sous une épaisseur de 2 à 3 centimètres d'eau courante. L'œuf de truite pondu est un gros globule jaunâtre de 6 millimètres de diamètre environ, revêtu d'une épaisse coque translucide. A l'un des pôles, on aperçoit une tache claire, la tache germinative. La segmentation commence aussitôt après la fécondation. Le développement dure environ 2 mois jusqu'à l'éclosion, mais ce temps est variable, de sorte que l'indication de l'âge de l'embryon n'est pas un point de repère suffisant. Il faut y ajouter des caractères anatomiques (1).

Fig. 353. — Montrant la manière d'ouvrir un œuf de truite pour recueillir le disque germinatif. Le blastoderme est vu par transparence à travers la coque dans laquelle s'enfonce la pointe gauche des ciseaux.

L'embryon apparaît, quelques jours après la fécondation, à la partie postérieure du disque germinatif : à ce niveau, le bourrelet marginal du disque prend l'aspect d'un bourgeon en forme de massue qui proémine vers le centre du disque germinatif. Pendant que l'embryon s'allonge, le blastoderme s'étale de plus en plus sur le vitellus. Le bourrelet marginal atteint bientôt l'équateur, puis ses bords se rapprochent et circonscrivent un champ vitellin ellipsoïde de plus en plus petit. Au bout d'une dizaine de jours, et alors que l'embryon est déjà bien formé et pourvu d'une vingtaine de somites (stade H), le blastoderme recouvre tout le vitellus : la bordure marginale n'embrasse plus qu'un très petit champ elliptique situé à l'extrémité caudale de l'embryon et bientôt réduit à une simple fente.

L'embryon est trop fragile pour qu'on puisse le recueillir intact en ouvrant l'œuf directement. Il faut d'abord placer celui-ci dans un réactif qui pénètre les pores de la coque et fasse subir à l'embryon un commencement de fixation. Une autre difficulté consiste dans la coagulation du vitellus par l'eau et par la plupart des réactifs fixateurs, ce qui gêne la confection des coupes. On remédie à cette difficulté en se servant de fixateurs très riches en acide acétique qui dissolvent le vitellus ; mais ces réactifs acides, très avantageux aussi à cause de leur grand pouvoir de pénétration, ne conservent pas l'hémoglobine. On fixera donc les embryons par deux sortes de réactifs : les uns, acides, très pénétrants, donneront des préparations excellentes pour les phases qui précèdent l'apparition du pigment sanguin, les autres, comme les mélanges bichromate-sublimé-formol, fixeront l'hémoglobine.

(1) Henneguy (*J. de l'Anatomie*, XXIV, 1888) a désigné par les lettres de l'alphabet de A à H un certain nombre de stades primitifs auxquels correspondent des caractères anatomiques particuliers. Ces désignations ont été continuées par Laguesse (*J. de l'Anatomie*, XXVI, 1890) pour les stades ultérieurs. L'âge de l'embryon est noté par rapport à la durée entière du développement intra-ovulaire : un embryon de 10/60 est un embryon du 10e jour après la fécondation dans une ponte dont les premières éclosions ont eu lieu 60 jours après la fécondation.

L'œuf est d'abord placé dans un mélange bichromate-sublimé acétifié à 10 p. 100 jusqu'à ce que l'embryon devienne très apparent sous la coque, et de couleur blanche, ce qui arrive en général au bout d'une demi-heure. L'œuf est alors saisi de la main gauche avec une pince spéciale, ressemblant à celle des pisciculteurs et dont les mors sont en forme de cuillère. L'œuf est tenu de manière que l'embryon se trouve exactement entre les mors. De la main droite, avec la pointe de fins ciseaux, on perce la coque au-dessous de l'extrémité caudale de l'embryon ; on maintient l'œuf en refermant les ciseaux ; on lâche la pince à mors creux ; avec une fine pince à dissection on saisit la lèvre gauche de l'incision ; les ciseaux peuvent alors achever la section de l'œuf suivant un plan équatorial, dans un cristallisoir rempli d'eau salée à 8 p. 1.000. L'œuf est ainsi divisé en deux hémisphères, dont l'un contient tout l'embryon ; ce dernier est agité doucement dans l'eau salée, l'embryon avec son blastoderme se détache et flotte. Avec une spatule, on le porte d'abord dans un nouveau cristallisoir rempli d'eau salée pour le débarrasser du vitellus, puis dans un mélange bichromate-sublimé acétifié à 5 p. 100, ou dans un mélange bichromate-sublimé-formol où on le laisse pour achever sa fixation.

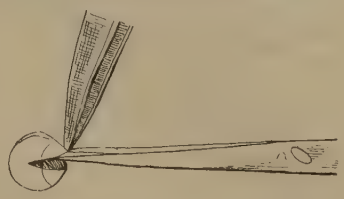


Fig. 354. — Manière d'ouvrir un œuf de truite, 2e temps. Le bord de l'incision est saisi avec les pinces et les ciseaux achèvent la section.

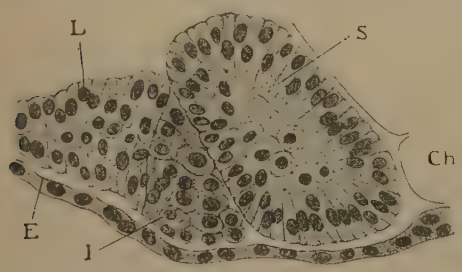


Fig. 355. — Embryon de truite, coupe de la région du tronc.

Ch, chorde ; — *E*, endoderme ou hypoblaste ; — *L*, lame latérale du mésoderme ; — *S*, somite ; — I, lame intermédiaire. D'après Swaen et Brachet.

Dans les stades où l'hémoglobine commence à apparaître, les fixateurs acétifiés seront remplacées par un mélange bichromate-sublimé-formol, qu'on utilisera de la même manière.

La formation du sang sera surtout étudiée sur des coupes transversales du disque germinatif, perpendiculaires à l'axe de l'embryon, après inclusion à la paraffine ou à la celloïdine. Dans les stades avancés, on pourra aussi utiliser des lambeaux du sac vitellin montés à plat, mais ces préparations sont loin de valoir celles qu'on obtient avec le sac vitellin des Mammifères et des Sauropsidés. Enfin, en éclairant convenablement l'œuf, on peut, à travers la coque, avec une loupe ou un microscope binoculaire, suivre le développement de l'embryon et observer la circulatien à la surface du vitellus ; ces observations à l'état vivant donnent des renseignements fort utiles. Lorsque l'embryon a atteint un développement assez avancé, cette observation à l'état vivant peut être faite après avoir ouvert l'œuf.

Chez de jeunes embryons de truite possédant 12 à 15 protovertèbres, le mésoderme, sur les coupes transversales, apparaît de chaque côté de l'axe neural formé de deux portions : une portion interne, le futur somite, une portion externe, la plaque latérale qui se divise elle-même en deux feuillets, feuillet viscéral et feuillet pariétal. C'est à l'union de la protovertèbre et de la plaque latérale

qu'on voit se différencier le groupement cellulaire qui est l'origine de l'ébauche sanguine. C'est la *lame intermédiaire*. Cette lame s'avance du côté ventral et s'insinue, de chaque côté, entre la protovertèbre, l'endoderme de la gouttière intestinale et la corde dorsale. Cette ébauche est ainsi primitivement double. Elle forme les *cordons sanguins*. Puis les deux ébauches se rapprochent et se fusionnent en une masse unique axiale, épais cordon situé exactement entre la corde dorsale et l'intestin, limité de chaque côté par les somites, les canalicules

Fig. 356. — Embryon de truite, 14 jours après la fécondation. Stade I. Coupe transversale. Dislocation de la masse intermédiaire (*Mi*) ou ébauche sanguine dont les éléments commencent à se dissocier dans un plasma, et forment les cellules sanguines primitives; plusieurs sont en voie de division.

A, aorte; — *I*, intestin; — *Ec*, ectoderme; — *M*, moelle épinière; — *C*, corde dorsale; — *S*, somite; — *L*, *L*, lames latérales (mésoderme non segmenté); — *Nv*, noyau vitellin; — *N*, canal excréteur du pronéphros. 210 diam.

du rein primordial et la plaque latérale. C'est la *masse intermédiaire* (1), ou ébauche sanguine.

Sur des coupes passant au niveau du rein primitif, le cordon sanguin apparaît nettement distinct de l'aorte au-dessous de laquelle il est situé et à laquelle il est intimement accolé. Sur des coupes passant plus en arrière, dans la région caudale la masse des cellules sanguines est engainée par un endothélium et forme l'ébauche pleine de la veine cardinale.

Les cellules qui forment l'ébauche sanguine sont d'abord intimement unies. Elles ne tardent pas à se dissocier légèrement : elles apparaissent alors réguliè-

(1) Œllacher, *Zeitschrift f. wiss. Zoologie*, XXIII, 1873 ; — Wenckebach, *Archiv. f. mikr. An.* XXVIII, 1886 ; — Ziegler, *Archiv. f. mikr. Anatomie*, XXX, 1887 ; — Henneguy, *J. de l'Anatomie*, XXIV, 1888 ; — Swaen et Brachet, *Archives de Biologie*, XVI, 1900 et XVIII, 1902 — Sobotta, *An. Hefte*, XIX, 1902 ; — Mollier, *Hertwig's Handbuch der Entwickelungsgeschichte*, I, 1906.

rement arrondies, avec un gros noyau rond, un cytoplasme prenant les couleurs nucléaires. Elles sont ainsi absolument semblables aux *cellules sanguines primitives* des Vertébrés supérieurs. Elles se multiplient activement par mitose. Vers la partie moyenne de l'embryon, la masse des cellules sanguines primitives s'étale de chaque côté de l'intestin à la surface du vitellus, et les cellules sanguines rondes et libres s'écoulent à la surface du syncytium vitellin, dans des gouttières sans paroi, peu marquées, revêtues simplement par le mésoderme périphérique, qui secondairement sont transformées en tubes endothéliaux. Les cellules sanguines primitives qui résultent de la dissociation de l'ébauche et qui commencent à circuler à la surface du vitellus sont ainsi des cellules sans hémoglobine. C'est à ce moment que l'hémoglobine commence à apparaître. L'évolution ultérieure des cellules sanguines, leur transformation en *hématies primordiales*, rondes, et en *hématies définitives*, elliptiques, ne diffère pas essentiellement de celle que nous avons étudiée chez les Sélaciens et les Sauropsidés.

Fig. 357. — Embryon de truite 14 jours après la fécondation. Coupe transversale. Cellules de la masse intermédiaire en dislocation. Cellules sanguines primitives. 900 diam.

Les masses intermédiaires sont des ébauches communes de l'aorte, de la veine axiale (veine cardinale postérieure) et de tous les globules rouges qui apparaissent dans le corps de l'embryon (1).

L'ébauche sanguine des Poissons osseux est d'origine mésodermique, puisqu'elle

Fig. 358. — Embryon de truite, 20 jours après la fécondation (Stade K). Coupe de la veine vitelline (*Vv*) contenant uniquement des hématies primordiales, dont beaucoup sont en mitose.

E, ectoderme; — *M*, mésoderme; — *V*, masse vitelline. 465 diam.

provient de la lame latérale du feuillet moyen. Mais cette ébauche est-elle l'unique source des premières cellules sanguines ? Certains auteurs ont soutenu que l'endoderme vitellin fabriquait aussi directement des cellules sanguines. Mais les rapports que les cellules sanguines affectent avec l'endoderme vitellin sont secondaires ; les cellules de la masse intermédiaire dissociée arrivent secondairement à la surface du vitellus. Il est possible seulement que ce contact secondaire

(1) Swaen et Brachet, *Archives de Biologie*, 1900 et 1902.

ait une influence sur leur évolution ultérieure, car, chez la truite, l'apparition de l'hémoglobine suit de très près cet étalement. Cette manière de voir, il est vrai, ne peut s'appliquer qu'aux téléostéens à gros œufs. Chez les Poissons osseux marins à petits œufs, dont le développement est très rapide, les cellules sanguines apparaissent très tard, et même après l'éclosion. Le sang qui circule dans les vaisseaux est à ce moment un plasma privé de globules. Ici, il ne se forme pas de véritable masse intermédiaire; les cellules qui la représentent sont rares et disséminées, ou bien elles ne forment un cordon sanguin que dans la portion caudale (1).

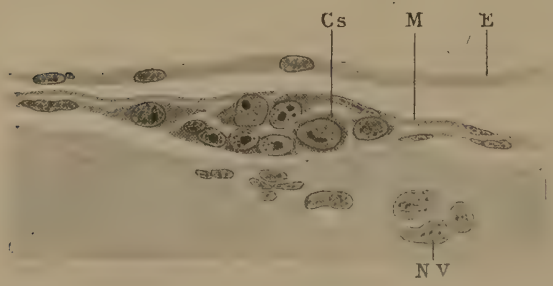


Fig. 359. — Embryon de truite 14 jours après la fécondation (stade I). Ébauche sanguine périphérique.

M, mésoderme extra-embryonnaire; — *Cs*, cellule sanguine primitive; — *E*, ectoderme ; — *NV*, noyaux vitellins 750 diam.

Si l'endoderme ou syncytium vitellin ne fabrique pas de cellules sanguines, on peut voir, chez la truite, au stade où la masse intermédiaire se dissocie, des cellules sanguines qui, à la surface du vitellus, se forment directement, isolément ou par petits groupes, aux dépens des cellules du mésoderme extra-embryonnaire. Ce mode de différenciation est discret et n'a qu'une part minime à la formation de la masse sanguine ; mais il est intéressant parce qu'il représente peut-être un mode primitif de la formation des ébauches sanguines chez ces animaux (2).

Ce qui, en effet, distingue la formation du sang chez les Poissons osseux, c'est que l'ébauche sanguine primitive apparaît dans le corps de l'embryon au lieu d'apparaître à distance, à la surface du vitellus, comme chez les Sélaciens. Cela tient évidemment à ce que le mésoblaste ne s'étale que tardivement à la surface du vitellus. Mais quelle est la raison d'une pareille disposition ? On peut supposer que par suite des conditions particulières et favorables où se trouve l'œuf au point de vue de sa nutrition, le besoin d'utiliser les réserves vitellines ne s'est pas fait sentir tout de suite. La formation de l'embryon à la

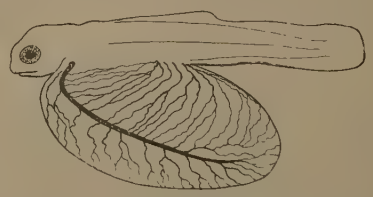


Fig. 360. — Jeune truite venant d'éclore et montrant la vascularisation et les rapports du sac vitellin. La veine vitelline gauche est seule développée ; la droite, visible encore sur la figure, est atrophiée. Grossi 3 fois.

(1) Swaen et Brachet, *Archives de Biologie*, XVIII, 1902. Les masses intermédiaires très réduites sont surtout ici des ébauches vasculaires ; on ne sait pas encore exactement comment se forment les premières hématies.

(2) Jolly, *S. de Biologie*, 1920. D'après Swaen et Brachet (*Archives de Biologie*, 1900 et 1902 et Brachet, *Embryologie*), ces ébauches sanguines périphériques proviennent de la masse intermédiaire. Au moment de sa dissociation, celle-ci abandonne des cellules isolées qui se répandent à la surface du syncytium, s'accumulent dans des lacunes et deviennent des centres de prolifération dont les uns donneront des endothéliums vasculaires et dont les autres se comporteront comme de petits îlots sanguins disséminés.

surface du blastoderme a été en avance et la formation du réseau vitellin a retardé. On peut supposer l'existence d'espèces primitives de téléostéens chez lesquelles les ébauches sanguines se seraient formées à la surface du vitellus, aux dépens du mésoderme périphérique. Par suite du développement rapide et précoce de l'embryon, la portion du mésoderme périphérique destinée primitivement à former les ébauches sanguines a été entraînée dans le corps du jeune poisson. Par ces phénomènes de concentration, l'ébauche sanguine s'est rapprochée du point d'insertion de la plaque latérale. Les lames intermédiaires représenteraient ainsi les ébauches sanguines vitellines absorbées secondairement dans la masse de l'embryon. On doit s'attendre alors à trouver des espèces qui montreraient l'ébauche sanguine dans des positions plus éloignées de l'axe de l'embryon. Les observations de *Mollier* (1), chez les Ganoïdes viennent à l'appui de cette manière de voir. Chez ces animaux, l'ébauche sanguine primitive a la forme d'un fer à cheval situé sur le vitellus, à peu de distance de l'embryon et qui embrasse dans sa concavité l'extrémité caudale ; mais, comme on le voit sur les coupes, ces ébauches se prolongent jusque dans les parties latérales du corps de l'embryon sous forme de cordons analogues aux cordons sanguins des Téléostéens. On peut considérer cette disposition comme intermédiaire à celle qu'on observe chez les Sélaciens et à celle que montrent les Téléostéens. Chez ces derniers, seule la portion des ébauches sanguines la plus rapprochée de l'embryon a subsisté et elle a été incorporée peu à peu. En définitive, l'ébauche sanguine médiane des Téléostéens a la même signification que les ébauches périphériques, vitellines, des Sélaciens et des Sauropsidés (2).

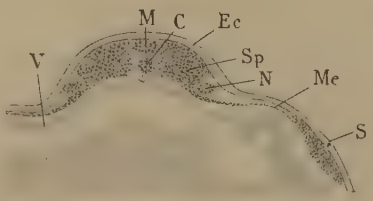


Fig. 361. — Œuf d'esturgeon (*Acipenser sturio*). Coupe transversale du disque germinatif.

M, moelle épinière; — *C*, corde dorsale; — *E*, ectoderme; — *Sp*, segment primordial; — *N*, pronephros ; — *Me*, mésoderme non segmenté; — *S*, ébauche sanguine; — *V*, endoderme vitellin. D'après Mollier.

Batraciens et Cyclostomes. — Les œufs des Batraciens sont très riches en vitellus, mais contrairement à ce qui se passe chez les Oiseaux, les Reptiles et les Poissons, l'œuf tout entier prend part à la segmentation. La masse vitelline est enveloppée par l'ectoderme ; elle se segmente, et ses cellules contribuent surtout à former le tube digestif et le foie. Au niveau du blastopore, l'ectoderme s'invagine et se continue avec l'endoderme qui revêt la cavité digestive primitive ou gastruléenne. Dans l'épaisseur des lèvres du blastopore apparaît le mésoderme qui de là s'avance, en dehors, entre l'ectoderme et l'endoderme. La portion du feuillet mésodermique qui part de la lèvre dorsale du blastopore et qui se

(1) Mollier, *Hertwig's Handbuch*, 1906.

(2) Les relations des cordons sanguins avec la formation des vaisseaux ne sont pas encore bien élucidées. Au moment où la jeune truite va éclore, la circulation du sac vitellin est complète. Le sang du réseau vitellin est conduit au cœur par les veines marginales ou vitellines dont la droite entre en régression et dont la gauche seule persiste. Le sang de l'embryon arrive par la veine sous-intestinale et à travers le foie jusqu'au réseau vitellin. Celui-ci est donc exclusivement veineux et constitue un système porte placé sur le trajet de la veine sous-intestinale.

trouve de chaque côté de l'axe neural et de la corde se segmente seule (1). La portion du mésoderme qui part de la lèvre ventrale du blastopore ne se segmente pas et ne se fissure pas. C'est aux dépens de ce *mésoblaste ventral* que se forment les ébauches sanguines (2). Chez les Urodèles (Triton, axololt), elles apparaissent formées par un cordon ventral dont la portion postérieure, caudale ne forme qu'une paroi vasculaire et dont la portion antérieure, céphalique, embrasse le foie et apparaît donc double sur les coupes tranversales de l'embryon faites à ce niveau. Ces cordons sanguins, épaississements localisés du mésoderme, sont accolés au vitellus. C'est ce qui a fait penser à quelques auteurs qu'ils étaient d'origine endodermique. Plus tard, ils sont enveloppés par des cellules mésodermiques qui leur forment un endothélium vasculaire. Dans sa partie antérieure, double et symétrique, l'ébauche sanguine est ainsi transformée, de chaque côté, en une veine vitelline qui relie ensuite l'ébauche sanguine au cœur. La transformation du cordon sanguin en vaisseau rempli de cellules libres progresse du côté caudal de l'embryon. Finalement, le cordon sanguin, dans sa portion caudale, est transformé en une veine sous-intestinale qui se bifurque en avant en deux veines vitellines qui rejoignent le cœur. Les cellules sanguines dissociées par le plasma, se trouvent libres dans ces vaisseaux. Enfin, dans le reste du mésoderme sont apparues des ébauches vasculaires vides de sang, semblables à celles que nous avons étudiées chez d'autres vertébrés, et qui complètent le réseau vitellin.

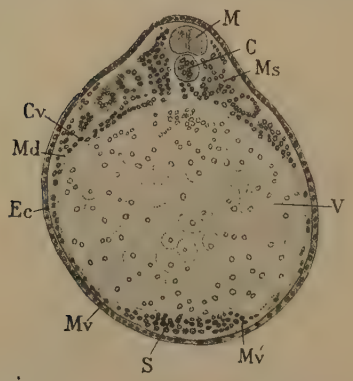


Fig. 362. — Œuf de triton. Embryon possédant 20 paires de protovertèbres. Coupe transversale passant à travers l'ébauche sanguine ventrale (*S*) formée aux dépens du mésoderme ventral (*Mv*) et à laquelle la masse vitelline (*V*) donne probablement un certain nombre de cellules.

M; moelle épinière; — *C*, corde dorsale; — *Ms*, mésoderme segmenté (somites); — *Cv*, germes vasculaires : — *Md*, mésoderme dorsal; — *Ec*, ectoderme. D'après Mollier.

La formation de l'ébauche sanguine est, chez les Anoures, très semblable, dans ses traits fondamentaux, à celle que nous venons de décrire chez les Urodèles.

Les rapports originels des ébauches sanguines avec les feuillets sont encore l'objet de discussions. Il semble à peu près certain que les ébauches sont d'origine mésodermique. La richesse de l'œuf en vitellus, les phénomènes de clivage et de délamination qui se produisent dans la formation du feuillet moyen rendent les faits d'observation plus difficiles à interpréter; c'est ce qui explique que certains auteurs admettent encore une certaine participation de l'endoderme à la formation des ébauches sanguines (3).

(1) Cette portion du mésoderme a été distinguée sous le nom de mésodermé dorsal, axial. Sa portion la plus voisine de l'axe neural se segmente; sa portion distale se fissure en une lame splanchnique et une lame somatique. Le mésoderme ventral ne subit ni segmentation ni fissuration.

(2) Mollier, *Hertwig's Handbuch*, I, 1906 ; — Mietens, *Jenaische Zeitschrift*, XLV, 1909 ; — Hilton, *J. of morphology*, XXIV, 1913.

(3) D'après les recherches de Brachet chez a grenouille rousse, le mésoblaste ventral

Ainsi, chez les Batraciens, le sang se forme aux dépens d'ébauches indépendantes du cœur qui apparaissent, à la partie inférieure de la masse vitelline, sous forme d'un cordon, bifurqué en avant. Ces ébauches, qui se transforment en vaisseaux remplis de sang, sont absolument comparables aux îlots sanguins des Sauropsidés.

Les cellules sanguines mises en liberté par la dissociation de l'ébauche et baignant dans du plasma, se trouvent d'abord contenues dans des lacunes déprimant la paroi du tube digestif, et ne possédant pas encore d'endothélium ; celui-ci apparaît secondairement.

Les *cellules sanguines primitives* nées de la dissociation des cordons sanguins sont des éléments incolores, à noyau arrondi, qui subissent ensuite la même évolution que chez les Sauropsidés et les Poissons. Elle est seulement plus difficile à suivre en raison de l'abondance du vitellus dans ces tissus. Les cellules sanguines primitives se transforment en *hématies primordiales*, éléments hémoglobiques arrondis, puis en *hématies elliptiques, définitives* (1). Cette évolution se poursuit pendant longtemps. Dans le sang des larves d'urodèles et des têtards d'anoures, on peut voir encore des cellules sanguines primitives et des hématies primordiales qui se multiplient par mitose et se transforment en hématies définitives.

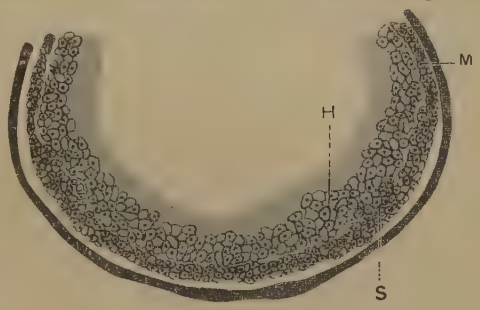


Fig. 363. — Œuf de grenouille; coupe transversale ; région ventrale. Formation de l'ébauche sanguine.

M, mésoblaste (lames latérales); — *H*, hypoblaste ou endoderme vitellin ; — *S*, ébauche sanguine recouverte en dehors par l'ectoderme ou épiblaste. D'après Brachet.

A une époque assez précoce du développement, le mésenchyme montre, comme chez les Sauropsidés et les Poissons, de grosses cellules lymphoïdes, formées aux dépens des cellules conjonctives embryonnaires et dont le protoplasma, basophile, est capable d'élaborer des granulations acidophiles. Ces éléments se transforment ainsi, les uns en lymphocytes, les autres en leucocytes, granuleux et non granuleux. Ces phénomènes se voient surtout dans le mésenchyme de la portion antérieure du corps, dans la tête, dans le tube digestif, dans la paroi de la chambre branchiale, dans la région du rein primordial. Dans le sang lui-même, particulièrement chez les larves d'urodèles, on peut voir une évolution de cellules lymphoïdes en leucocytes à noyau polymorphe et la formation de cellules fusiformes aux dépens de lymphocytes.

Au moment de la métamorphose, cette fabrication de leucocytes se localise en différents points, dans les parois de la cavité buccale, dans le rein, dans la capsule du foie (Urodèles), dans la rate, dans la moelle osseuse. Celle-ci est surtout

qui donne l'ébauche sanguine, se forme entièrement par clivage aux dépens d'un endoblaste qui se divise ainsi en mésoblaste et hypoblaste. (Cf. Brachet, *Traité d'Embryologie des Vertébrés*, Paris, 1921.)

(1) Maximow, 2e *Congrès int. des Anatomistes*, Bruxelles, 1910.

bien développée chez les Anoures et elle est, pendant toute la vie, le siège principal de la formation des cellules sanguines et le siège à peu près exclusif de la formation des hématies. Chez les Urodèles, au contraire, le sang, au moins chez certaines espèces, conserve un rôle hémopoiétique qui rappelle celui de la larve.

Les recherches de *Mollier* (1) sur les embryons de *Ceratodus* montrent que les premières ébauches sanguines se forment, chez les Dipneustes, exactement de la même façon que chez les Urodèles. Les recherches de *Goette*, de *Mollier*, chez *Petromyzon*, nous ont montré des faits très analogues. Mais ici, l'union de l'ébauche sanguine ventrale avec l'endoderme apparaît beaucoup plus intime. De bonne heure, d'après *Mollier*, on voit des groupes cellulaires qui se séparent de l'endoderme vitellin en même temps que le mésoblaste, et se transforment en cellules sanguines. Chez les vertébrés les plus inférieurs, on observerait donc des faits assez nets en faveur d'une origine endodermique des ébauches sanguines. Il est probable que l'origine endodermique ou mésodermique des ébauches, problème qui a soulevé tant de discussions et qui peut être considéré aujourd'hui comme résolu pour beaucoup de Vertébrés en faveur de l'origine mésoblastique, dépend seulement de la manière dont se forme le feuillet moyen et de la précocité plus ou moins grande d'apparition des ébauches. Chez *Petromyzon*, l'ébauche sanguine se dissocie et le sang s'écoule à la surface du vitellus avant d'être renfermé dans de véritables vaisseaux ; ce n'est qu'assez tard qu'il coule, à la surface du vitellus, dans des vaisseaux fermés.

RÉSUMÉ DES NOTIONS ACQUISES SUR LA FORMATION DU SANG DE L'EMBRYON

Au cours de cette longue analyse, nous avons acquis un certain nombre de faits qu'il convient maintenant de résumer. Le plus important, c'est que chez les Vertébrés, le sang se forme d'abord aux dépens d'ébauches indépendantes, distinctes du système cardio-vasculaire de l'embryon et qui apparaissent à distance de celui-ci, à la surface du vitellus, dans la zone marginale du feuillet mésoblastique. Les Oiseaux, les Reptiles et les Sélaciens nous offrent l'exemple le plus typique et le plus clair de cette disposition qui, chez eux, est facile à comprendre. Ici, l'embryon se nourrit aux dépens d'une abondante réserve de vitellus. Le sang, qui est l'intermédiaire entre les réserves nutritives et le corps de l'embryon, apparaît à distance de celui-ci, là où se trouve la réserve nutritive, au contact du vitellus.

Pour jouer utilement son rôle absorbant, l'aire vasculaire s'étale en surface et se munit de vaisseaux. C'est au niveau de son bord d'extension que les multiplications sont les plus abondantes, et c'est là qu'apparaissent les premiers germes vasculaires sanguins. Dans les cas les plus typiques, l'aire vasculaire marque ses limites

(1) Mollier, in *Hertwig's Handbuch*, 1906.

par la formation d'un vaisseau circulaire qui sera la principale voie pour amener au cœur les réserves. Mais le matériel cellulaire formé par la multiplication des cellules mésoblastiques au niveau du bord d'extension est plus abondant qu'il n'est nécessaire pour constituer des tubes vasculaires. Un grand nombre de cellules, les plus internes, deviendront des globules sanguins. L'apparition des cellules sanguines dans les germes vasculaires est la conséquence directe d'une active multiplication cellulaire suscitée par la présence des réserves. La cellule sanguine libre, dès sa première apparition, se montre ainsi, sous la fonction physiologique d'une cellule vectrice de matériaux nutritifs. A ce stade, en effet, elle ne contient pas encore de pigment respiratoire.

Par sa disposition étalée en surface, l'aire vasculaire joue aussi, mais secondairement, un rôle d'oxygénation. Ce rôle est parfaitement certain chez les Reptiles et chez les Oiseaux avant l'établissement de la circulation allantoïdienne. Chez les Mammifères, la disposition est restée la même ; mais les réserves n'existent plus dans la vésicule vitelline. Aussi, le réseau de l'aire vasculaire s'est-il adapté assez rapidement à un autre rôle : il entre en contact avec la muqueuse utérine, il facilite les échanges entre l'organisme maternel et l'embryon avant la formation du placenta allantoïdien, définitif. Au lieu de puiser en dedans, dans la vésicule ombilicale, il puise en dehors, dans la muqueuse utérine. La disparition du vitellus est une conséquence directe du parasitisme de l'œuf. L'adaptation de l'aire vasculaire à cette nouvelle fonction coïncide avec l'apparition d'une épaisse caduque réfléchie, et avec la disparition complète et précoce de la cavité du sac vitellin chez les Rongeurs à feuillets invaginés. Ce placenta « omphaloïde », comme on l'a appelé, existe seul, chez les Mammifères les plus inférieurs, chez lesquels il ne se forme pas de placenta allantoïdien.

Chez les Batraciens et les Cyclostomes, la réserve nutritive de l'œuf n'est pas emmagasinée dans un sac spécial distinct de l'embryon ; elle est accumulée dans les portions internes et ventrales de l'œuf qui se segmentent à leur tour. Cette masse vitelline est absolument comparable à la vésicule vitelline des Sauropsidés et le sang se forme à sa surface exactement de la même façon.

Il existe une exception, au premier abord, assez difficile à comprendre ; c'est celle que nous montrent les Poissons osseux chez lesquels les premières ébauches sanguines se forment, comme nous l'avons vu, dans le corps de l'embryon. Cette disposition est en rapport avec un retard dans le développement du mésoblaste périphé-

rique et de l'aire vasculaire et un développement précoce de l'embryon. On peut supposer que la portion du mésoderme qui doit former les ébauches sanguines a été incorporée prématurément dans l'intérieur du bourrelet embryonnaire par un phénomène de concentration. On peut supposer aussi que les ébauches vitellines, périphériques ont secondairement disparu et qu'elles existaient chez les ancêtres des Poissons osseux.

Prenant naissance à la surface du vitellus, les ébauches sanguines sont, au moment de leur apparition, au contact direct de l'endoderme, et, lorsqu'elles se libèrent du feuillet mésodermique, elles se placent toujours au-dessous de lui, entre lui et l'endoderme. La question de l'origine endodermique ou mésodermique des ébauches sanguines est à peu près solutionnée aujourd'hui. Dans le plus grand nombre des cas, les ébauches apparaissent au sein d'un mésoderme déjà formé ; c'est ce qu'on voit nettement chez les Vertébrés supérieurs. La participation des cellules endodermiques, est, au contraire, visible chez les Vertébrés les plus inférieurs (Cyclostomes, Batraciens, Dipneustes, Sélaciens) chez lesquels le mésoblaste est plus longtemps confondu avec le feuillet interne primitif ; mais cette participation ne peut être considérée que comme accessoire.

Les rapports anatomiques des ébauches sanguines avec l'endoderme n'en restent pas moins très étroits, même chez les Oiseaux et les Mammifères. Cette situation toute spéciale n'est pas circonstancielle, elle est fondamentale, et s'explique par le rôle que joue d'abord le sang chez l'embryon, celui de vecteur des réserves vitellines (1).

Chez les Reptiles, chez les Oiseaux, et même chez les Mammifères, les premières ébauches sanguines apparaissent dans cette portion du mésoderme périphérique qui se détache de l'extrémité caudale de la ligne primitive, en un point qui correspond, par conséquent, à la lèvre ventrale du blastopore. Si l'on n'observait que les Vertébrés supérieurs, il serait impossible de comprendre la raison de cette disposition. Chez les Batraciens, elle apparaît nettement. Chez eux, comme on le voit bien sur une coupe sagittale, la portion supérieure de l'œuf est occupée par l'axe nerveux ; au-dessous de lui se trouve le tube digestif, creusé, pour ainsi dire, dans la masse vitelline qui

(1) L'apparition de l'hémoglobine est secondaire ; les premières hématies n'ont pas d'hémoglobine. Chez les Poissons osseux, l'hémoglobine n'apparaît que lorsque les cellules sanguines se sont disséminées à la surface du vitellus. Chez certains Téléostéens à développement rapide, l'hémoglobine n'apparaît qu'après l'éclosion. L'amphyoxus ne possède pas d'hématies et ici il ne se forme pas non plus de mésoblaste ventral. L'apparition du sang rouge semble liée, chez les Vertébrés, à l'aquisition d'un endoblaste riche en vitellus qui apparaît pour la première fois chez les Cyclostomes.

occupe tout l'espace compris entre l'intestin primitif et la paroi ventrale de l'œuf. La nappe absorbante, la nappe sanguine, faite pour puiser ces réserves et les amener au cœur, se formera au contact de la face ventrale de la masse vitelline, entre le blastopore et le cœur. Lorsque l'œuf deviendra un œuf à gros vitellus et à segmentation discoïdale, comme chez les Reptiles, l'ébauche sanguine, gardant ses rapports originels, apparaîtra d'abord dans cette portion du mésoderme qui part de la lèvre ventrale du blastopore représenté par la plaque primitive des Reptiles et par la ligne primitive des Oiseaux et des Mammifères (1).

Chez les Ichtyopsidés et les Sauropsidés, la cellule sanguine primitive, incolore, subit une évolution semblable. Elle se transforme d'abord en une cellule hémoglobique globuleuse, l'*hématie primordiale*, qui s'aplatit, devient discoïde et elliptique, et forme l'*hématie définitive*. Chez les Mammifères, l'évolution de la cellule sanguine primitive est un peu plus compliquée : pendant une première phase du développement, elle ne donne que des *hématies primordiales* qui se chargent de plus en plus d'hémoglobine, puis disparaissent assez vite ; elles ne sont pas destinées à devenir les hématies définitives du jeune organisme. Dans une deuxième phase, les cellules sanguines primitives forment, par multiplication, des cellules mères, incolores, lymphoïdes, plus petites, qui acquièrent de l'hémoglobine, se transforment en hématies secondaires ; celles-ci perdent leur noyau, surtout par dégénérescence, transformation chimique et dissolution de la chromatine et deviennent les hématies définitives.

Les cellules sanguines primitives de l'aire vasculaire sont à peu près toutes destinées à former des hématies. Un petit nombre seulement sont des cellules mères de leucocytes. Ceux-ci se forment surtout dans le mésenchyme. Dans le tissu conjonctif embryonnaire du sac vitellin, puis de l'embryon, à des stades très précoces, mais après la formation des premières hématies, on voit apparaître de grosses cellules lymphoïdes, à noyau arrondi, souvent nucléolé, à protoplasma basophile, qui se forment directement aux dépens des cellules mésodermiques. Ces cellules lymphoïdes primordiales sont fort semblables aux cellules sanguines primitives intravasculaires et elles ont, du reste, la même origine : le feuillet mésoblastique. Elles forment, en différents points du corps de l'embryon, des foyers, et sont l'origine

(1) D'après certaines expériences, le rôle formateur de cette région serait déjà déterminé à un stade très précoce. Ainsi Hahn, en énucléant la portion postérieure de la ligne primitive sur de jeunes disques germinatifs, a réussi à empêcher presque complètement la formation des ébauches sanguines.

du tissu lymphoïde, des lymphocytes et des leucocytes granuleux.

Chez les Sélaciens, les Reptiles et les Oiseaux, les vaisseaux du sac vitellin jouent, pendant longtemps, un rôle important dans l'hémopoièse ; ce rôle s'efface à la fin du développement en même temps que le tissu lymphoïde formateur s'accumule dans divers organes. Chez certains mammifères, le sac vitellin ou vésicule ombilicale, bien qu'il ait perdu sa fonction originelle, continue, pendant longtemps, à fabriquer des hématies. Il est, chez le lapin par exemple, le principal foyer de formation des globules rouges de l'embryon. Chez d'autres mammifères, et chez l'homme, le rôle hémopoiëtique du sac vitellin est transitoire ; le tissu conjonctif embryonnaire, le foie, la rate, enfin, en dernier lieu, la moelle osseuse, viennent le remplacer dans sa tâche.

COUNTWAY LIBRARY
HC 25XP 8

DATE DUE

DEMCO 38-297